ZUR WIRKUNGSWEISE DES BOROMYCINS

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

WALTER PACHE
aus Freiwaldau/CSSR

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543901_0004

ZUR WIRKUNGSWEISE DES BOROMYCINS

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

WALTER PACHE
aus Freiwaldau/CSSR

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 6.2.1969

D e k a n : Professor Dr. H. Blume

1. Berichterstatter : Professor Dr. H. Zähner

2. Berichterstatter : Professor Dr. Dr. G. Weitzel

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner im Institut für Mikrobiologie der Universität Tübingen durchgeführt. Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Zähner für die Überlassung des Themas sowie für die ausgezeichnete Betreuung und Förderung bei der vorliegenden Arbeit. Den übrigen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Weiterhin gilt mein Dank all denen, die mir durch ihre Unterstützung und die Benutzung ihrer Geräte bei meiner Arbeit weiterhalfen: Prof. Dr. W. Simon und Frl. L. Pioda, ETH Zürich; Doz. Dr. H. Uehlecke, Pharmakologisches Institut Tübingen; Doz. Dr. D. Dütting, Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen; Herr A. Bacher, Chemisches Institut Tübingen.

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung 1

II. Methoden 3

1. Chemikalien, Antibiotika und Geräte 3

2. Organismen und Nährmedien 4

3. Züchtung von Bacillus subtilis und Plattentest. 5

4. Verfolgung des Wachstums bei Clostridium pasteurianum 5

5. Isolierung und Charakterisierung des Lipoproteins aus Eigelb 5

a) Ammonsulfatfällung 5

b) Elektrophorese 6

c) Sedimentationsverhalten in der Ultrazentrifuge 6

d) Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration 7

e) Bestimmung des Lipidgehaltes und Analyse der Lipidfraktion 7

f) Fraktionierung des Lipoproteins an DEAE-Zellulose 7

g) Abbau des Lipoproteins mit Phospholipase C ... 8

6. Untersuchung der Wechselwirkung von Boromycin und Phytol 9

a) Dünnschichtchromatografie 9

b) Infrarotspektren 9

7. Bindung von Boromycin und anderen Antibiotika an Lipoprotein 9

8. Versuche zur Bindung des Boromycins in der Zelle 10

a) Borbestimmung und Isolierung der Cytoplasmamembran 10

Seite

b)Bindung von Boromycin an ganze Zellen..... 10

c)Bindung von Boromycin an Membranproteine.... 11

9. Messung der Synthese von Protein, RNS und DNS in vivo..... 11

a)Versuchsanordnung..... 11

b)Bestimmung von Protein, RNS und DNS..... 12

10. Warburgversuche..... 12

11. Untersuchung des phosphoroclastischen Systems aus Clostridium pasteurianum..... 13

a)Isolierung des phosphoroclastischen Systems. 13

b)Untersuchung der phosphoroclastischen Reaktion unter Boromycinzusatz..... 13

12. Versuche zur Beeinflussung der Boromycinwirkung durch Kaliumionen..... 14

a)Kaliumbestimmung..... 14

b)Austritt von Kaliumionen aus Zellen unter dem Einfluss von Boromycin..... 14

c)Bestimmung der Aktivität der K^+-Na^+-aktivierbaren ATPase der Cytoplasmamembran.. 15

d)Bestimmung der Kaliumionenspezifität des Boromycins mittels EMK-Messungen..... 16

13. Synthese- und Abbauversuche..... 16

a)Synthese des D-Valinmethylester-Trimethylborat-Komplexes..... 16

b)Abbau des Boromycins und Chromatografie von Borverbindungen..... 17

III. Versuchsergebnisse..... 18

1. Hemmkonzentration des Boromycins, Abhängigkeit der Hemmung von der Wachstumsphase und Prüfung auf Resistenzentstehung..... 18

2. Suche nach Antagonisten des Boromycins..... 18

3. Isolierung und Charakterisierung des Lipoproteins aus Eigelb..... 21

a)Eigenschaften..... 21

Seite

b) Elektrophorese 23

c) Sedimentationsverhalten 23

d) Molekulargewichtsbestimmung 24

e) Lipidbestimmung 25

f) Qualitative Analyse des Lipidanteils 25

g) Quantitative Analyse des Lipidanteils 26

h) Vergleich des Lipoproteins mit β-Lipovitellin 26

i) Abbau des Lipoproteins mit Phospholipase C 30

4. Bestimmung der Inhibitionsindices von Boromycin-Phytol und Boromycin-Lipoprotein, Reversibilität der Hemmung 31

5. Wechselwirkung des Boromycins mit Phytol und Lipoprotein 32

a) Wechselwirkung Boromycin-Phytol 32

b) Wechselwirkung Boromycin-Lipoprotein 35

6. Modell der Wechselwirkung 37

7. Kreuztest und Bindung verschiedener Antibiotika mit Lipoprotein 39

8. Bindung von Boromycin an ganze Zellen und isolierte Membranfragmente von Bacillus subtilis. 43

9. Verfolgung der Boromycinbindung in der Zelle.. 45

10. Untersuchung einer möglichen detergensartigen Wirkung des Boromycins 46

11. Verfolgung der Synthese von Protein, RNS und DNS in vivo sowie der Atmung unter dem Einfluss von Boromycin 47

12. Hemmung von Clostridium pasteurianum durch Boromycin und Einfluss des Antibiotikums auf die phosphoroclastische Reaktion 50

13. Aufhebung der Boromycinwirkung durch Kaliumionen 52

14. Beeinflussung des Kaliumstoffwechsels durch Boromycin 54

Seite

a) Beeinflussung der Permeabilität für Kaliumionen 54

b) Einfluss des Boromycins auf die Aktivität der K^+-Na^+-aktivierbaren ATPase der Membran. 55

c) Wirkungsweise des Boromycins 56

15. Permeabilitätsbeeinflussung durch Antibiotika-EMK-Messungen an synthetischen Membranen 56

16. Struktur-Wirkungsbeziehungen beim Boromycin ... 58

IV. Diskussion 59

V. Zusammenfassung 70

VI. Literaturverzeichnis 71

In der vorliegenden Arbeit wurden
die folgenden Abkürzungen benutzt:

ADP	: Adenosindiphosphat
ATP	: Adenosintriphosphat
ATPase	: Adenosintriphosphatase (ATP phosphohydrolase)
CD	: Circulardichroismus
DEAE-Zellulose	: Diäthylaminoäthylzellulose
DNS	: Desoxyribonucleinsäure
EMK	: Elektromotorische Kraft
IR	: Infrarot
MG	: Molekulargewicht
NMR	: Kernmagnetische Resonanz
ORD	: Optische Rotationsdispersion
RNS	: Ribonucleinsäure
TEAE-Zellulose	: Triäthylaminoäthylzellulose
TG	: Trockengewicht
Tris	: Tris (hydroxymethyl) - aminomethan

I. E I N L E I T U N G

Unsere Kenntnisse der molekularen Prozesse der lebenden Zelle haben sich in den letzten 15 Jahren rasch vermehrt. Das ist nicht zuletzt ein Erfolg der Verwendung von Antibiotika, deren spezifische Wirkung ein Studium dieser Vorgänge ermöglichte. Als Musterbeispiel gilt die Aufklärung der Zellwandsynthese bei grampositiven Bakterien, ein Forschungsgebiet, dessen Entwicklung eigentlich erst durch die Ergebnisse der mit Penicillin durchgeführten Versuche eingeleitet wurde (Park und Johnson, 1949). Und unsere heutige detaillierte Kenntnis des Mechanismus der ribosomalen Proteinsynthese ist eng verknüpft mit dem Einsatz spezifischer Hemmstoffe wie Chloramphenicol, Streptomycin und Puromycin, deren Verwendung bei Untersuchungen der Proteinsynthese bereits zur Routine geworden ist (Gottlieb, 1967).
Unter diesem Gesichtspunkt erschien die Untersuchung der Wirkungsweise eines neuartigen, von Hütter u.a. (1967) beschriebenen Antibiotikums interessant, da es den ersten bekannten borhaltigen Naturstoff darstellt. Dieses Boromycin ist ein lipophiler Neutralstoff (MG 866, Summenformel $C_{44}H_{72}O_{15}NB$), der ein Molekül D-Valin sowie ein Molekül Borsäure pro Molekül gebunden enthält. Den Rest der Molekel stellt wahrscheinlich eine Polyhydroxyverbindung vom Makrolidtypus dar, die endgültige Struktur dieses Ringsystems ist aber noch nicht bekannt.
Für die Untersuchung der Wirkungsweise des Boromycins erschienen zwei Wege möglich. Einmal konnte die Wirkung des Boromycins zur Rolle des Bors im Stoffwechsel in irgendeiner Beziehung stehen. Leider liegen über die physiologische Rolle des Bors (Bersin, 1963) nur spärliche Ergebnisse vor, die hier kurz zusammengefasst seien. Die Komplexbildung des Borats mit Diolen führt zu einer Beeinflussung des Kohlenhydrat- und Nucleinsäurestoffwechsels, wie von Lee und Aronoff (1967) sowie Shkolnik u.a. (1965) berichtet wird. Eine Förderung der Pollenkeimung von Pflanzen durch Borat beobachteten Bamzai und Randhova (1967).

Die negativen Resultate der Versuche, bei Mikroorganismen eine Abhängigkeit für Borat festzustellen (Zittle,1951;Gerloff,1968) mögen dadurch bedingt sein, dass es praktisch nicht gelingt, Mikroorganismen unter Bormangel zu züchten. Spuren von Borat finden sich überall, bedingt durch die Verwendung borhaltiger Gläser im Laboratorium. Auch die Analytik des Bors ist unbefriedigend. Die Farbreaktionen zum Nachweis sind störanfällig und müssen nach Veraschung der Probe in konzentrierter Schwefelsäure ausgeführt werden (Koch und Koch-Dedic,1964). Ferner existiert auch kein radioaktives Isotop des Bors mit ausreichender Halbwertszeit.

Vorversuche zur Ermittlung einer Beziehung der Boromycinwirkung zum nur ungenügend aufgeklärten Borstoffwechsel (Antagonisierung durch Intermediärprodukte des Kohlenhydrat- und Nucleinsäurestoffwechsels, Beeinflussung der Sporenkeimung) ergaben aber keinerlei Hinweis auf eine solche Beziehung. Aus diesem Grund und wegen der angeführten Schwierigkeiten bei der Untersuchung des Borstoffwechsels erschien es nicht angebracht, einem möglichen Zusammenhang weiter nachzugehen. Das Schwergewicht der Untersuchungen wurde vielmehr auf den zweiten möglichen Weg gelegt, nämlich die Ermittlung der Wirkungsweise des Boromycins unabhängig von einer möglichen Rolle des Bors bei der Wirkung. Da in Vorversuchen festgestellt werden konnte, dass Stoffe existieren, die die Wirkung des Boromycins aufheben, war es naheliegend, diesen zweiten Weg zu gehen und zu versuchen, über die Isolierung und Charakterisierung solcher Stoffe einen Hinweis auf die Wirkungsweise des Antibiotikums zu erhalten. Getrennt von der Untersuchung der Wirkungsweise war zu klären, wie weit das Bor an der antibiotischen Wirkung des Boromycins beteiligt ist. Durch die Möglichkeit der schrittweisen Abspaltung von D-Valin und Borsäure liess sich diese Frage zum Teil beantworten. Die Untersuchungen wurden aber durch die geringe Menge des zu Verfügung stehenden Boromycins (200 mg) begrenzt. Eine Diskussion der Ergebnisse muss allerdings auf Grund der unvollständig bekannten Struktur des Antibiotikums zwangsläufig spekulativ bleiben.

II. METHODEN.

1. Chemikalien, Antibiotika und Geräte.

Soweit möglich, wurden analysenreine Chemikalien der Firma Merck, Darmstadt verwendet. Die Chemikalien für die Züchtungen etc. waren die bei Poralla (1967) und Crueger (1968) aufgeführten. An weiteren, dort nicht genannten Chemikalien und Antibiotika wurden die folgenden eingesetzt:

Borsäureester	Theodor Schuchardt, München
Desoxyribonuclease	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Katalase	Boehringer & Söhne, Mannheim
Lysozym	Boehringer & Söhne, Mannheim
Phospholipase C	Calbiochem, Los Angeles, USA
Urease	Serva Entwicklungslabor, Heidelberg
Actinomycin C_3	Prof.Dr.H.Brockmann, Göttingen
Azaserin	Probe von C.Stock, aus Streptomycetenstamm 04926.
Boromycin	Prof.Dr.W.Keller, Zürich. Aus ETH 28829 isoliert.
Cycloserin	Sigma Chem., London
Enniatin A	Frl. L. Pioda, Zürich
Enniatin B	Frl. L. Pioda, Zürich
Fusidinsäure	Löwen Pharma, Düsseldorf
Gramicidin D	Serva Entwicklungslabor, Heidelberg.
Gramicidin S	Aus Bacillus brevis, ATCC 9999 isoliert.
Nonactin	Prof.Dr.W.Keller, Zürich. Aus ETH 9828 gewonnen.
Neomycin	Byk, Golden, Lomberg, Konstanz.
Patulin	Prof.Dr.W.Keller, Zürich

Phleomycin	Bristol Laboratories, Syracus,US
Polymyxin	Pfizer & Co.Inc.,New York, USA
Puromycin	Serva Entwicklungslabor,Heidelbe
Valinomycin	Prof.Dr.H.Brockmann,Göttingen
Vancomycin	Eli Lilly & Co.,Indianapolis,USA

Geräte: Für die Züchtung und Aufarbeitung der Bakterien wurden die üblichen Geräte (Poralla, 1967; Müller, 1968) benutzt.

2. Organismen und Nährmedien.

Die Wirkungsweise des Boromycins wurde mit Bacillus subtilis Cohn (Stamm Tü 203 des Instituts für Mikrobiologie) als Testorganismus untersucht.

Für einzelne Versuche fanden noch folgende Organismen Verwendung:

Escherichia coli K 12	Institut für Mikrobiologie der Universität (Tü 201)
Clostridium pasteurianum Winogradsky	American Type Culture Collection (ATCC 6013)
Paecilomyces varioti Bainier	Institut für Mikrobiologie der Universität (Tü 137).

Die Nährmedien für die Züchtung der oben genannten Organismen waren folgende:

Komplexmedium für Bacillus subtilis u.Escherichia coli:	Fleischextrakt-Peptonmedium ohne Zusatz von Calciumcarbonat.(Corbaz u.a., 1957).
Komplexmedium für Clostridium pasteurianum:	Bacto AC Medium (Difco Manual 9. ed., Detroit, USA p.201)
Komplexmedium für Paecilomyces varioti:	Hefe-Malz-Agar (Müller, 1968)
Definiertes Medium für Bacillus subtilis:	Hütter u.a.,1966
Definiertes Medium für Clostridium pasteurianum:	Carnahan und Castle,1958

3. Züchtung von Bacillus subtilis und Plattentest.

Züchtung, Biophotometerversuche und Bereiten der Sporensuspension erfolgten analog den Vorschriften von Poralla (1967). Das Wachstum wurde durch Messen der Trübung mit einem Eppendorf Photometer (Netheler u. Hinz, Hamburg) bei 578 nm in 1 cm- Küvetten verfolgt. Durch Verdünnen, Ausplatten auf Komplexmedium und Auszählen der viable counts wurde ermittelt, dass eine Extinktion von 0,100 bei 578 nm in der logarithmischen Wachstumsphase der Zellen einer Keimzahl von 10^6 Keimen pro ml entspricht. Diese Extinktion entspricht ferner einem Bakterien-Trockengewicht von 0,3 mg/ml. Der Plattendiffusionstest wurde nach Cooper (1963), Kreuztest, (Bonifas, 1952; Juillard, 1957) und Streifengradiententest nach Zähner (1965) ausgeführt.

4. Verfolgung des Wachstums bei Clostridium pasteurianum.

Clostridium pasteurianum wurde auf Bacto AC Medium angezüchtet. In diesem Komplexmedium kann das Wachstum durch Trübungsmessung verfolgt werden.

In definiertem Medium (Carnahan und Castle, 1958) ist durch den Zusatz von Calciumcarbonat die direkte Verfolgung des Wachstums durch Trübungsmessung nicht möglich. Eine annähernde Messung gelingt nach Ansäuern auf pH 3 zur Auflösung des Calciumcarbonats.

Zu 5 ml Bakterienkultur werden 0,1 ml Salzsäure 32%ig gegeben und sofort anschliessend die Trübung bei 578 nm gemessen.

5. Isolierung und Charakterisierung des Lipoproteins aus Eigelb.

a. Ammonsulfatfällung.

Der Dotter von Hühnereiern wurde vom Eiweiss durch Abdekan -

tieren getrennt und von Eiweissresten durch Abrollen auf Filtrierpapier befreit. Darauf wurde die den Dotter umgebende Haut angestochen und das auslaufende Eigelb in einem Messzylinder aufgefangen. Nach Verdünnen mit destilliertem Wasser auf das doppelte Volumen erfolgte die Fällung durch Zutropfen einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung unter Rühren. Zur Abtrennung der gefällten Proteine wurde 30 min. bei 25000 U/min (=50000 g) zentrifugiert.

b. Elektrophorese.

Die Lösung des Proteins in 0,1 molarem Phosphatpuffer vom pH 7,0 wurde auf Cellogelstreifen aufgetragen. Die Serva-Elektrophoreseapparatur wurde mit demselben Puffer gefüllt. Die Laufzeit betrug 30 min. bei einer Spannung von 140 Volt. Die Anfärbung erfolgte mit einer Lösung von 0,5 g Ponceau S, 7,5 g Trichloressigsäure und 7,5 g Sulfosalicylsäure in 250 ml Wasser. Entfärbt wurde mit 5%iger Essigsäure. Zur photometrischen Auswertung wurden die Banden ausgeschnitten, in 2 ml Aceton gelöst und die Extinktion der Lösung bei 512 nm gemessen.

c. Sedimentationsverhalten in der Ultrazentrifuge.

Die Versuche wurden mit einer Ultrazentrifuge vom Typ Spinco L 50 (Beckman Instruments, München) ausgeführt. Der verwendete Rotor trug die Bezeichnung SW 50. In Gläschen von 5 ml Fassungsvermögen wurde ein Sucrosegradient (5-20% Sucrose) eingefüllt und das zu untersuchende Protein in 0,2 ml Phosphatpuffer (0,2m, pH 7,0) auf die Sucroselösung geschichtet. Nach einer Laufzeit von 6 Std. bei 50 000 U/min (= 200 000 g) und 2°C wurden die Gläschen mit einer Nadel angestochen und der Inhalt in 20 Fraktionen zu 0,25 ml aufgefangen. Der Proteingehalt der Fraktionen wurde durch Messen der UV-Absorption bei 280 nm bestimmt.

d. Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration.

Biogel P 300 wurde zum Quellen in 0,2 m Phosphatpuffer vom pH 7,0 gerührt und nach 24 Std. in die Säule gegeben. Die Dimension der Säule betrug 50 x 1,5 cm. Zur Stabilisierung der Geloberfläche wurde die Füllung noch mit einer 0,5 cm hohen Schicht von im selben Puffer gequollenen Biogel P 2 überschichtet.

Nach Äquilibrieren der Säule wurden die Proteine (je 10 mg) gelöst in 0,5 ml Puffer aufgetragen. Das Eluat wurde in Portionen von etwa 1 ml aufgefangen und das Elutionsvolumen der Proteine durch Messen der UV-Absorption bei 280 nm sowie Sammeln der Fraktionen in einem Messzylinder bestimmt. Zur Eichung dienten Alkoholdehydrogenase aus Hefe (MG 130 000), Katalase aus Rinderherz (MG 240 000), sowie Urease aus Sojabohnen (MG 480 000). Das Ausschluss-Volumen der Säule wurde ausserdem mit Dextranblau (MG 2 000 000) bestimmt.

e. Bestimmung des Lipidgehaltes und Analyse der Lipidfraktion.

Die Lipidbestimmung des Lipoproteins wurde nach der Vorschrift von Bligh und Dyer (1959) ausgeführt. Parallel zur Lipidbestimmung wurde das Trockengewicht des Lipoproteins bestimmt.

Die Auswahl der Laufmittel für die dünnschichtchromatografische Analyse der Lipidfraktion erfolgte nach Stahl (1962), die quantitative Cholesterinbestimmung nach Boyd (1954) und die Trennung von Phospholipiden und Neutralfetten nach Fairbairn (1945) sowie Bishop u.a.(1967).

f. Fraktionierung des Lipoproteins an Diäthylaminoäthylzellulose.

30 g Diäthylaminoäthylzellulose (DE 52) wurden mit 0,2 m Phosphatpuffer vom pH 6,8 äquilibriert und in eine Säule mit 2 cm Durchmesser gefüllt. Die Höhe der Zelluloseschicht

betrug 16 cm. 0,1 g frisch isoliertes Lipoprotein wurden in 50 ml des obigen Puffers gelöst und auf die Säule gegeben. Darauf wurde mit Puffer solange nachgewaschen, bis die Extinktion des Eluats auf 0,020 gemessen bei 280 nm, gesunken war. Nun wurde mit Phosphatpuffer eluiert, der 0,1 molar an Natriumchlorid war. Nach erneutem Absinken der Extinktion auf 0,020 wurde mit 0,2 m NaCl in Phosphatpuffer eluiert. Das Eluat wurde in 5 ml - Portionen aufgefangen. Die Anzahl der aufgefangenen Fraktionen betrug 80.

g. Abbau des Lipoproteins mit Phospholipase C.

Der Abbau erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von Lenard und Singer (1968).
523 mg frisches Lipoprotein wurden in 100 ml Puffer gelöst. Der Puffer (5mM Tris.HCl pH 7,3) enthielt 5 Millimol Calciumchlorid und 0,1 Mol Kaliumchlorid pro Liter. Nach Temperieren bei 37° wurde zu 50 ml dieser Lösung 10 mg Phospholipase C (3,3 Einheiten/mg) gegeben, die restlichen 50 ml dienten als Referenzlösung. Nach 10, 20 und 30 min. wurden je 10 ml entnommen und die Reaktion durch Zusatz von 0,5 ml 20%iger Trichloressigsäure gestoppt. Das ausgefallene Protein wurde abzentrifugiert (15 min. bei 20 000 g). Der Überstand wurde nach Hydrolyse der gebildeten phosphorylierten Amine (Bartlett, 1959) für die Phosphatbestimmung eingesetzt (Bock, 1967).

Eine andere Probe derselben Charge Lipoprotein wurde in einem Porzellantiegel eingewogen und das Trockengewicht bestimmt. Nach dem Trocknen und Wiegen wurde das Protein unter Zusatz von Soda verascht. Die Schmelze wurde in heissem Wasser gelöst und mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert. Die Lösung wurde auf ein definiertes Volumen aufgefüllt und ein aliquoter Teil für die Bestimmung des Gesamt-Phosphats eingesetzt.

6. Untersuchung der Wechselwirkung von Boromycin und Phytol.

a. Dünnschichtchromatografie.

Die Mischung von Boromycin und Phytol wurde in dem zu untersuchenden Lösungsmittel gelöst (Konzentration jeweils 1 mg/ml) und auf eine Kieselgelplatte aufgetragen. Ebenso wurde mit den Referenzsubstanzen verfahren. Als Lösungsmittel wurden Systeme unterschiedlicher Polarität untersucht (siehe Tabelle 10). Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte durch Besprühen mit 50%iger Schwefelsäure und kurzes Erhitzen auf 110° C.

b. Infrarotspektren.

Zur Aufnahme der Spektren (IR-Spektralphotometer Leitz, Wetzlar) wurden die Substanzen in analysenreinem, wasserfreien Tetrachlorkohlenstoff gelöst. Die Messung erfolgte in Steinsalzküvetten von 0,5 mm Schichtdicke. Zur Kompensation der Eigenabsorption des Tetrachlorkohlenstoffs wurde gegen eine Küvette mit Tetrachlorkohlenstoff gemessen. Die Konzentration an Boromycin und Phytol betrug jeweils 10 mg/ml.

7. Bindung von Boromycin und anderen Antibiotika an Lipoprotein.

10 ml einer Lösung mit 10 µg Antibiotikum/ml (Phosphatpuffer 0,1 molar, pH 7,0) werden mit 100 mg frisch isoliertem Lipoprotein versetzt und 30 min. bei Zimmertemperatur gerührt, worauf das Lipoprotein in Lösung gegangen ist. Durch Zusatz von 20 ml destilliertem Wasser wird das Protein quantitativ ausgefällt und durch 10 min. langes Zentrifugieren bei 15 000 U/min (= 20 000 g) abgetrennt.
Im Überstand wird das Antibiotikum mittels Plattendiffusionstest (Pipettieren in ausgestanzte Löcher) bestimmt. Aus 4

Messungen wird der Durchschnitt errechnet. In einer analog behandelten, das heisst ebenfalls zentrifugierten Lösung des Antibiotikums ohne Lipoproteinzusatz wird die Konzentration an Antibiotikum nach derselben Methode bestimmt. Eine Differenz der Hemmhofdurchmesser der Lösungen mit und ohne Lipoproteinzusatz zeigt eine Bindung des Antibiotikums. Verschiedene Antibiotika wurden wegen der grösseren Genauigkeit mit anderen Testorganismen als Bacillus subtilis bestimmt. So erfolgte die Bestimmung des Polymyxins mit Escherichia coli K 12 und des Valinomycins mit Paecilomyces varioti Bainier.

8. Versuche zur Bindung des Boromycins in der Zelle.

a. Borbestimmung und Isolierung der Cytoplasmamembran

Borbestimmungen wurden nach der Methode von Smith u.a.(1955) ausgeführt.

Bei der Isolierung des Membransystems von Bacillus subtilis lag die Vorschrift von Salton und Freer (1965) zugrunde.

b. Bindung von Boromycin an ganze Zellen.

Zu 10 ml 0,2 m Phosphatpuffer vom pH 7,0 mit einem Boromycingehalt von 10 µg/ml wurden 0,5 ml einer Bakteriensuspension gegeben. Die Bakteriensuspension enthielt eine bestimmte Einwaage an Zellen, von denen parallel dazu das Trockengewicht bestimmt wurde. Daraus liess sich das Zelltrockengewicht der zur Boromycinlösung zugesetzten 0,5 ml Bakteriensuspension berechnen.

Die Suspension der Zellen in der Antibiotikumlösung wurde 30 min bei Zimmertemperatur gerührt und darauf 15 min bei 10 000 U/min (= 10 000 g) abgeschleudert. Im Überstand wurde mit dem Plattendiffusionstest das nicht adsorbierte Boro-

mycin bestimmt. Die Menge gebundenes Boromycin ergab sich aus der Differenz zum Boromycingehalt einer entsprechend verdünnten und zentrifugierten Vergleichslösung.

c. Bindung von Boromycin an Membranproteine.

In ein Zentrifugenglas wurde eine bestimmte Menge frisch isoliertes und gewaschenes Membranprotein eingewogen und 20 ml einer Boromycinlösung in Phosphatpuffer (siehe 8 b) zugefügt. Nach 30 min Rühren bei Zimmertemperatur wurden die Membranproteine abgeschleudert und im Überstand das Boromycin bestimmt.

Wegen der Inhomogenität der Membranpreparation wurde das Trockengewicht der für die Bindungsversuche eingesetzten Membranproteine nicht aus einer parallel ausgeführten Trockengewichtsbestimmung berechnet wie im Versuch 8 b. Das Sediment nach dem Zentrifugieren wurde vielmehr in einen gewogenen Porzellantiegel gespült, auf dem Wasserbad die überschüssige Flüssigkeit eingedampft und der Rückstand nach 2-stündigem Trocknen bei 105° gewogen.

9. Messung der Synthese von Protein, RNS und DNS in vivo.

a. Versuchsanordnung.

Die Züchtung der Bakterien erfolgt in definiertem Medium. Die auf eine optische Dichte von 0,100 (gemessen bei 578 nm) eingestellte Kultur wurde in 500 ml Kolben mit Einstich bei 37° und 120 U/min inkubiert. Der Versuch wurde nach Anstieg der optischen Dichteauf 0,3 - 0,4 begonnen und bei der Dichte 0,8 - 1,0 beendet. Damit war gewährleistet, dass sich die Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase befanden.

Die Kolben waren mit 150 ml Kultur beschickt. Nach 0, 15, 30, 45 und 60 min wurden aus jedem Kolben 3 Proben von 1,0 ml

entnommen. Für die Bestimmung der DNS wurden Kolben mit 4 Einstichen mit 200 ml Kultur beschickt und die Probemenge betrug 20 ml. Der Zusatz von Boromycin erfolgte jeweils nach 30 min. Das Antibiotikum wurde gelöst in 0,1 ml Äthanol zugesetzt. Die Konzentration in der Kultur betrug dann 0,05 µg/ml.

b. Bestimmung von Protein, RNS und DNS.

Für die Bestimmung von Protein (Lowry u.a., 1951), RNS (Mejbaum, 1939) und DNS (Dische, 1930) in den Bakterienzellen wurde nach der von Poralla (1967) in Anlehnung an die Methoden von Schneider (1957) modifizierten Vorschrift vorgegangen.

10. Warburgversuche.

Die Versuche wurden mit einer Kultur ausgeführt, die mit frischer Nährlösung auf eine optische Dichte von 0,3 (gemessen bei 578 nm) verdünnt war.

Die Versuchstemperatur betrug 37°, die Frequenz der Antriebswelle 200 U/min und die Amplitude der Schüttelbewegung 3 cm. (Warburgapparat Fa.Braun, Melsungen). Die Versuchsdauer betrug 30 - 60 min, als Gasphase wurde reiner Sauerstoff gewählt. Die Gläschen enthielten 2 ml der Bakteriensuspension, 0,1 ml 20%ige Kalilauge zur Kohlendioxidabsorption im Einsatz sowie 0,1 ml der Boromycinlösung im Seitenarm. Das Boromycin wurde in wässriger Lösung zugegeben, um ein Austrocknen der Lösung im Seitenarm beim Begasen und Temperieren zu vermeiden.

Die Berechnung der Manometerkonstanten erfolgte nach Umbreit u.a. (1957). Als Absorptionskoeffizient für Sauerstoff wurde der für Ringerlösung angegebene Wert eingesetzt.

11. Untersuchung des phosphoroclastischen Systems aus Clostridium pasteurianum.

a. Isolierung des phosphoroclastischen Systems.

3 g Zellen wurden in 50 ml 0,05 m Phosphatpuffer vom pH 6,5 aufgeschlämmt und in einem Stahlbecher durch 5 min langes Behandeln mit Ultraschall aufgeschlossen. Dabei wurde durch Kühlung des Bechers mit Eis - Kochsalz - Mischung dafür gesorgt, dass die Temperatur nicht über 5° stieg. Danach wurden Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen in der Kühlzentrifuge abgeschleudert (30 min, 40 000 g) und der Überstand für die Untersuchung der phosphoroclastischen Reaktion verwendet. Die Proteinbestimmung im Überstand nach Lowry u.a. (1951) ergab einen Proteingehalt von 2,75 mg/ml.

b. Untersuchung der phosphoroclastischen Reaktion unter Boromycinzusatz.

Die Bestimmung der Acetylphosphatbildung erfolgte nach der Vorschrift nach Lovenberg u.a. (1963), die Bestimmung der Acethydroxamsäure nach Lipman und Tuttle (1945).

Der Reaktionsansatz enthielt in 1 ml :

25 µmol	Phosphat pH 6,5
10 µmol	Brenztraubensäure-Na-Salz
5 µmol	Coenzym A
0-100 µg	Boromycin
1,38 mg	Protein

Das Boromycin wurde in konzentrierter Lösung (10 mg/ml Äthanol) mit einer Mikropipette zugegeben, um eine Denaturierung des Proteins durch den Alkohol zu verhindern.

12. Versuche zur Beeinflussung der Boromycinwirkung durch Kaliumionen.

a. Kaliumbestimmung.

9 ml der zu untersuchenden Lösung mit annähernd neutralem pH wurden mit 1 ml Pufferlösung folgender Zusammensetzung gemischt:

5 g Caesiumchlorid
25 g Aluminiumnitrat
100 ml Wasser

In der Mischung wurde mit dem Flammenphotometer (Netheler & Hinz, Hamburg) die Emmision bei 768 nm bestimmt. Der Kaliumgehalt der Probe wurde einer Eichkurve entnommen.

b. Austritt von Kaliumionen aus Zellen unter dem Einfluss von Boromycin.

Bacillus subtilis wurde in definiertem Medium bis zum Erreichen der stationären Phase gezüchtet. Darauf wurden die Zellen abgeschleudert und 2 x mit 0,1 m Glucoselösung gewaschen. Von diesen Zellen wurde eine bestimmte Menge abgewogen und das Trockengewicht bestimmt. Nach der Trockengewichtsbestimmung wurde das Material auf nassem Wege (Schwefelsäure / Salpetersäure) verascht und die überschüssige Salpetersäure auf dem Wasserbad eingedampft. Nach vorsichtigem Neutralisieren mit Ammoniaklösung wurde die Lösung auf ein definiertes Volumen verdünnt und ein aliquoter Teil für die Kaliumbestimmung (Gesamt-Kaliumgehalt der Zellen) abgezweigt.

Eine zweite Einwaage an Zellen wurde in einem bestimmten Volumen 0,1 m Glucose-Lösung suspendiert und die Trübung bei 578 nm gemessen. Die Suspension wurde nun mit Glucose-Lösung soweit verdünnt, dass die Extinktion bei 578 nm 0,500 betrug. Von dieser verdünnten Suspension, deren Gehalt an

Zellen genau bekannt ist, wurden je 50 ml in 500 ml - Erlenmeyer mit seitlichem Einstich gegeben und bei 37° geschüttelt. Nach dem Temperieren (30 min) wurde 0,1 ml Äthanol zupipettiert, der 25 µg Boromycin/ml enthielt. Das ergab einen Boromycingehalt von 0,05 µg/ml in der Zellsuspension. In die Kontrollen wurde reiner Alkohol pipettiert. Nach 10 min Schütteln bei 37° und 100 U/min wurden die Zellen bei 70 000 g (60 min, 25 000 U/min) abgeschleudert, um ein vollständiges Sedimentieren aller Zellen zu gewährleisten. Im Überstand wurde der Kaliumgehalt bestimmt. Die Differenz gegenüber den Kontrollwerten ergab den durch Boromycin verursachten Austritt von Kaliumionen.

c. Bestimmung der Aktivität der K^+-Na^+- aktivierbaren ATPase der Cytoplasmamembran.

Eine Membranpreparation aus 2,5 g Zellen wurde in 50 ml 0,1 Trispuffer vom pH 7,4 suspendiert und zur Homogenisierung 1 min unter Kühlung mit Ultraschall behandelt. Durch Trockengewichtsbestimmung wurde in dieser Suspension ein Proteingehalt von 4,0 mg/ml ermittelt.

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von Schoner u.a.(1967).

Der Bestimmungsansatz enthielt in 2 ml:

100 µmol Tris.HCl
100 µmol NaCl
0 - 100 µmol KCl
10 µmol $MgCl_2$
10 µmol ATP
0 - 50 µg Boromycin
800 µg Protein

Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe der Proteinsuspension. Als Mass für die Aktivität des Enzyms dient die Menge des nach Golterman und Wurz (1961) sowie Bock (1967) be-

stimmten freigesetzten anorganischen Phosphats.

d. Bestimmung der Kaliumionenspezifität des Boromycins mittels EMK-Messungen.

Die Messung wurden nach der von Pioda u.a. (1968) beschriebenen Methode ausgeführt.
100 mg Boromycin wurden in 3 ml Tetrachlorkohlenstoff gelöst und in der Messkette Ag - Boromycin in CCl_4 - Messgut - 0,1 m NH_4NO_3 - KCl ges. - Hg_2Cl_2 - Hg untersucht. Als Messgut dienten 10^{-1} molare Lösungen von Kaliumchlorid, Natriumchlorid und Lithiumchlorid im Wechsel gegen 10^{-3} molare Lösung von Lithiumchlorid. Die Messungen erfolgten bei Zimmertemperatur. Registriert wurde der Potentialsprung nach Wechseln des Messgutes.

13. Synthese- und Abbauversuche.

a. Synthese des D-Valinmethylester - Trimethylborat - Komplexes.

0,708 g D-Valinmethylester - Hydrochlorid (Synthese nach Greenstein und Winitz, 1961) werden in 2 ml Methanol gelöst, 0,5 g Triäthylamin zugesetzt und nach Zusatz von 100 ml absolutem Äther das ausgefallene Triäthylamin - Hydrochlorid abfiltriert. Zum Filtrat werden 150 ml Benzol zugesetzt und die Lösung auf etwa 30 ml eingedampft. Nach Zusatz von 10 ml Borsäuretrimethylester und weiteren 100 ml Benzol wird das Reaktionsgemisch 3-4 Tage bei Zimmertemperatur gut verschlossen aufbewahrt. Von einer geringen Menge ausgefallener Substanz wird abfiltriert und die Lösung eingedampft. Der Komplex fällt beim Eindampfen aus oder kristallisiert beim Verreiben des Rückstandes mit absolutem Äther.
Roh-Ausbeute 1,0 g (97 % d.Theorie), Fp 135-140°.
In dem Komplex ist die enthaltene Borsäure mit der Esterprobe und das D-Valin dünnschichtchromatografisch (Laufmittel Äthanol - Wasser 7:3) nachweisbar. Die Substanz ist wie der freie

Borsäureester extrem hygroskopisch und löst sich in polaren Lösungsmitteln unter Zersetzung, wie aus der Veränderung der IR-Spektren nach Umkristallisieren zu entnehmen ist.

b. Abbau des Boromycins und Chromatografie von Borverbindungen.

Der Abbau wurde nach Hütter u.a.(1967) mit 80 mg Boromycin ausgeführt. Die Abbauprodukte wurden dünnschichtchromatografisch auf ihre Einheitlichkeit getestet und die biologische Aktivität bestimmt. Die Prüfung auf Borgehalt bei den Abbauprodukten des Boromycins erfolgte durch Besprühen der Dünnschichtchromatogramme auf Kieselgel mit einer 0,2%igen Carminsäurelösung in konzentrierter Schwefelsäure. Die durch Zersetzung der Borverbindungen durch die Schwefelsäure freigesetzte Borsäure reagiert mit der Carminsäure (Smith u.a., 1955) unter Bildung eines rotvioletten Fleckes, während die übrige Kieselgelschicht eine leicht orangefarbene Tönung annimmt, von der sich die Flecken gut abheben.

Diese Entwicklungsmethode wurde mit Boromycin und käuflichen Borsäureestern getestet.

III. V E R S U C H S E R G E B N I S S E

1. Hemmkonzentration des Boromycins, Abhängigkeit der Hemmung von der Wachstumsphase und Prüfung auf Resistenzentstehung.

Die Hemmkonzentration des Boromycins bei Bacillus subtilis in definiertem Medium wurde mit der Verdünnungsreihe und im Biophotometer bestimmt. Abb. 1 zeigt den Verlauf der Wachstumskurven im Biophotometer bei 0,05 und 0,1 µg Boromycin/ml. Die Konzentration, bei der noch eine Wachstumsverzögerung eintritt, ist 0,05 µg / ml. Bei 0,1 µg / ml ist die Wachstumshemmung bereits vollständig.

Ferner wurde untersucht, ob die Boromycinwirkung auf eine bestimmte Wachstumsphase der Zellen beschränkt ist. Aus Abb.1 ist ersichtlich, dass das nicht der Fall ist. Boromycin wirkt in allen Wachstumsphasen bei gleicher Konzentration. Eine geringfügige Erhöhung der Hemmkonzentration in der stationären Phase ist auf den Einfluss der Populationsdichte auf die Hemmkonzentration zurückzuführen.

Inkubiert man die Biophotometergläschen nach Boromycinzusatz etwa 8 Stunden lang weiter, so beginnen die Zellen wieder zu wachsen. Eine Selektion resistenter Zellen wäre denkbar, aber ein erneuter Zusatz von Boromycin zeigt, dass die wieder gewachsenen Zellen noch die gleiche Empfindlichkeit gegen das Antibiotikum besitzen.

2. Suche nach Antagonisten des Boromycins.

Mit Boromycinlösung getränkte Filterrondelle zeigen im Plattendiffusionstest auf definiertem Medium eine grössere und klarere Hemmzone als auf komplexem Medium. Daraus folgt, dass im Komplexmedium Stoffe enthalten sein müssen, die die Wirkung des Boromycins beeinflussen.

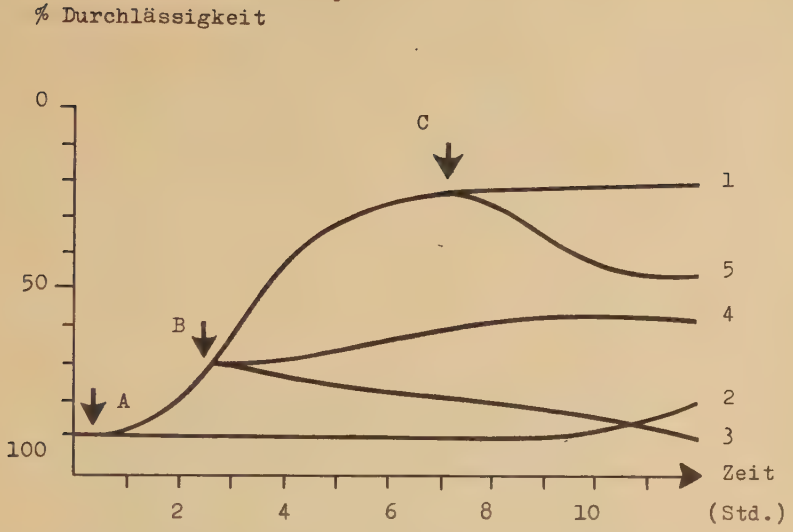

Abb. 1 : Ermittlung der Hemmkonzentration von Boromycin für Bacillus subtilis in definiertem Medium.

Zusatz von Boromycin bei A, B, C. 1: Kontrolle. 2: 0,05 µg Boromycin / ml (A). 3: 0,05 µg / ml (B). 4: 0,1 µg/ml (B). 5: 0,1 µg/ ml (C).

Bei der Suche nach solchen Stoffen wurden Kulturfiltrate verschiedener Streptomycetenstämme untersucht, die im Kreuztest eine geringe Antagonisierung des Boromycins zeigen. Aufarbeitungsversuche zeigten, dass zugesetztes Tween 80 die Ausbeute an Antagonist steigert. Diese Wirkung war aber dadurch bedingt, dass Tween 80 selbst eine Aufhebung der Boromycinwirkung verursacht. Daraufhin wurde eine Reihe oberflächenaktiver Stoffe (Tabelle 1) im Kreuztest untersucht, und bei allen eine mehr oder minder gute Aufhebung der Boromycinwirkung gefunden. Abb. 2 zeigt als Beispiel einen Kreuztest mit Phytol, das wegen seiner guten Wirkung als Modellsubstanz für die weiteren Versuche ausgewählt wurde.

Tabelle 1 : Im Kreuztest gegen Boromycin geprüfte oberflächenaktive Stoffe.

Lecithin	Geraniol	Cetylalkohol
Cholesterin	Farnesol	1-Eicosanol
Glykocholsäure	Phytol	Stearinsäur
		Arachinsäur
		Linolsäure

Abb. 2 : Aufhebung der Boromycinwirkung im Kreuztest.
Streifen waagrecht: 0,1 mg Boromycin / ml.
Streifen senkrecht: Phytol, unverdünnt.

Auf der Suche nach spezifischeren Antagonisten fiel die starke Aufhebung der Boromycinwirkung durch Eigelb auf. Daraufhin wurde versucht, die aktive Substanz aus dem Dotter zu isolieren.

3. Isolierung und Charakterisierung des Lipoproteins aus Eigelb.

a. Eigenschaften.

Mit Hilfe einer quantitativen Auswertung des Kreuztestes wurde von verschiedenen Fraktionen der Ammonsulfatfällung die mit der höchsten spezifischen Aktivität für die weiteren Versuche ausgewählt. Es zeigt sich, dass diese Fraktion bei einer Sättigung von 55-65% ausfällt. Zur sauberen Abtrennung von den anderen Proteinen empfiehlt es sich, die Fällung bis zu 55% Sättigung in mehreren Fraktionen vorzunehmen, da die Lösung nach dem Zentrifugieren sonst leicht trübe ist.

Konsistenz und Färbung lassen darauf schliessen, dass das Protein einen beträchtlichen Anteil Lipide gebunden enthält, also ein Lipoprotein darstellt. Das Spektrum im sichtbaren Bereich zeigt Banden bei 486, 458 und 430 nm. Diese Absorption ist charakteristisch für ein Carotinoid (Chino u.a. 1967). Das UV-Spektrum ist wenig differenziert und zeigt nur eine Bande bei 270-280 nm, die von der Absorption des Proteinanteils herrührt.

Das frisch isolierte Protein hat einen Wassergehalt von durchschnittlich 50%, wie durch Trockengewichtsbestimmung ermittelt wurde. Das Protein löst sich nur in Puffer bestimmter Ionenstärke und fällt beim Verdünnen mit Wasser wieder aus. Beim Lösen in 0,1 m Phosphatpuffer von pH 7,0 und Verdünnen auf das Dreifache des ursprünglichen Puffervolumens ist die Ausfällung quantitativ. Durch diese Umfällung ist eine einfache Reinigung des isolierten Produktes möglich. Die biologische Aktivität des Lipoproteins ist aus Abb. 3 ersichtlich. Sie nimmt beim Stehenlassen der Lipoproteinlösung nach etwa 20 Std. ab, auch beim Aufbewahren im Kühlschrank. Extraktion der Lipoproteinlösung mit Äther vermindert die biologische Aktivität sehr stark, aber die mit dem Äther extrahierten Lipide zeigen nur eine geringe Aufhebung der Boromycinwirkung. Die biologische Aktivität scheint also an das intakte Lipoprotein geknüpft zu sein. Tabelle 2 zeigt die gefundenen Werte nach Ätherextraktion.

Abb. 3 : Aufhebung der Boromycinwirkung im Kreuztest durch Lipoprotein aus Eigelb.

Streifen waagrecht : 0,1 mg Boromycin / ml.
Streifen senkrecht : 100 mg Lipoprotein / ml.

Tabelle 2 : Biologische Aktivität des Lipoproteins nach Ätherextraktion. (Kreuztest).

Lösung	mg/ml	Hemm- bzw. Enthemmstrecke.
Boromycin	0,1	20 mm
Lipoprotein	100	20 mm
Lipoprotein nach Ätherextraktion (wässr.Phase)		12 mm
Ätherphase (konzentriert)	250	11 mm
wässrige Phase und Ätherphase (Streifen 2 x getränkt)		11 mm

b. Elektrophorese.

Zur Abklärung der Frage der Einheitlichkeit des isolierten Lipoproteins wurde eine Elektrophorese auf Cellogelstreifen bei pH 6,8 und 8,0 ausgeführt (bei niedrigeren pH-Werten löst sich das Lipoprotein nicht).

Bei pH 6,8 wandert das Protein als scharfe Bande zur Anode. Eine sehr schwache Bande läuft der Hauptbande voraus und eine gewisse Menge Protein, die offensichtlich denaturiert ist, bleibt am Startpunkt sitzen. Durch photometrische Auswertung lässt sich zeigen, dass der Anteil der Hauptbande 98 - 99% des gewanderten Proteins beträgt (Tabelle 3). Nach Ätherextraktion erscheint eine neue Bande und der Anteil des Proteins am Startpunkt steigt.

Tabelle 3 : Photometrische Auswertung der Elektrophorese. Trägermaterial Cellogel. Banden ausgeschnitten und in 2 ml Aceton gelöst.

Intaktes Protein:	Startpunkt	Bande I	Bande II	Bande III
E_{512}	0,011	0,142	0,002	-
nach Ätherextraktion:				
E_{512}	0,082	0,023	0,030	0,003

Auch bei pH 8,0 wandert das Protein als praktisch einheitliche Bande. Somit darf angenommen werden, dass das isolierte Lipoprotein eine einheitliche Fraktion darstellt.

c. Sedimentationsverhalten.

Um ein weiteres Kriterium für die Einheitlichkeit zu besitzen sowie um das Molekulargewicht zu bestimmen, wurde das Sedimentationsverhalten des Proteins in der Ultrazentrifuge untersucht.

Der Versuch ergab, dass das Lipoprotein auf Grund seines hohen Lipidgehaltes und der daraus resultierenden geringen Dichte (unter 1,0) nicht sedimentiert, sondern an der Oberfläche des Gradienten sitzenbleibt. Sedimentierende Begleitproteine konnten nicht beobachtet werden.

d. Molekulargewichtsbestimmung.

Um einen Anhaltspunkt über das Molekulargewicht des Lipoproteins zu gewinnen, wurde an einer mit Biogel P 300 gefüllten Säule das Ausschlussvolumen bestimmt. Geeicht wurde die Säule mit Alkoholdehydrogenase aus Hefe, Katalase aus Rinderherz, Urease aus Sojabohnen und Dextranblau. Zwischen dem Elutionsvolumen und dem Logarithmus des Molekulargewichts besteht ein linearer Zusammenhang (Andrews, 1964). Tabelle 4 zeigt die gefundenen Elutionsvolumina.

Tabelle 4 : Elutionsvolumina der untersuchten Proteine an der Biogelsäule (P 300). Säule 1,5 x 40 cm, Puffer 0,2 m Phosphat pH 7,0.

Protein	Molekulargewicht	Elutionsvolumen
Alkoholdehydrogenase	130 000	24,0 ml
Katalse	240 000	22,9 ml
Urease	480 000	18,3 ml
Dextranblau	2 000 000	18,3 ml
Lipoprotein	x	18,3 ml

Da das Lipoprotein das gleiche Elutionsvolumen besitzt wie Urease und Dextranblau und dieses Volumen gleich dem Ausschlussvolumen der Säule ist, ergibt sich nach den Angaben für die Gelsorte ein Molekulargewicht von 400 000 oder mehr für das Lipoprotein. Als weiteres Kriterium für die Einheitlichkeit mag

dienen, dass bei der Gelfiltration keine niedermolekularen Begleitproteine beobachtet werden konnten.

e. Lipidbestimmung.

Die Bestimmung des Lipidanteils nach der Methode von Bligh und Dyer (1959) ergab die in Tabelle 5 dargestellten Werte.

Tabelle 5 : Lipidbestimmung des Lipoproteins

Einwaage für Trockengewichtsbestimmung:	790,4 mg = 100%
Auswaage der Trockengewichtsbestimmung:	403,2 mg = 51%
Einwaage für die Lipidbestimmung:	489,1 mg
Auswaage an Lipid:	211,1 mg = 85% des TG.
Auswaage an Protein:	32,0 mg = 15% des TG.

Für eine andere Präparation wurde ein Lipidanteil von 86% gefunden. Der Anteil des Proteins liegt also aussergewöhnlich niedrig.

f. Qualitative Analyse des Lipidanteils.

Der mit Chloroform - Methanol extrahierte Lipidanteil zeigte im Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel mit Chloroform als Laufmittel 3 Flecken, die den Substanzklassen der Neutralfette, Steroide und Phosphatide entsprechen (Stahl, 1962). Diese Flecken wurden in den entsprechenden Laufmitteln aufgetrennt und mit Hilfe von Referenzsubstanzen identifiziert.

Die Phosphatide bestehen aus Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin. Der Steroidanteil dagegen besteht nur aus Cholesterin. Die Neutralfette zeigen zwar den gleichen Rf - Wert wie Tripalmitin, sind aber im Gegensatz zu diesem auch mit Kaliumpermanganatlösung anfärbbar. Das weist auf den ungesättigten Charakter der Neutralfette hin. Für das im Lipid

enthaltene Carotinoid konnte nur gezeigt werden, dass es nicht mit a- oder β-Carotin identisch ist.

g. Quantitative Analyse des Lipidanteils.

Die Cholesterinbestimmung nach Boyd (1954) ergab einen Cholesteringehalt des Lipids von etwa 3,5% (Tabelle 6).

Tabelle 6 : Cholesterinbestimmung im Lipidanteil des Lipoproteins.

mg Lipid / ml Eisessig	E_{578}	µg Cholesterin	%
6,92	0,232	240	3,47
13,84	0,460	477	3,45

Die Trennung der Phosphatide von den Neutralfetten nach Fairbairn (1945) ist in Tabelle 7 dargestellt. Im Anteil der Neutralfette ist der Cholesterinanteil mit enthalten. Die Auftrennung nach Bishop u.a. (1967) ergab identische Resultate.

Tabelle 7 : Zusammensetzung des Lipidanteils aus Phosphatiden und Neutralfetten.

	mg	%
Einwaage an Lipid:	821,7	100
Auswaage an Phosphatiden:	185,0	22,6
Auswaage an Neutralfetten:	634,5	77,4

h. Vergleich des Lipoproteins mit β-Lipovitellin.

Cook und Mitarbeiter haben die Lipoproteine aus Eigelb eingehend bearbeitet. (Cook, 1961). Es war nun naheliegend zu prüfen, ob das isolierte Lipoprotein mit einem der von Cook

beschriebenen Lipoproteine identisch ist.

Nach Cook enthält Eigelb 3 Lipoproteine: a- und ß-Lipovitellin in der "high-density-fraction", sowie das "low-density-fraction" Lipoprotein Lipovitellenin. Die Trennung erfolgt durch Zentrifugieren von mit 0,45 m $MgSO_4$- Lösung verdünntem Eigelb bei 30 000 U/min.(Bernardi und Cook, 1960). Die sich absetzende Fraktion enthält die beiden Lipovitelline, während sich das LDF-Lipoprotein im Überstand befindet. Die Trennung der beiden Lipovitelline kann an DEAE- oder TEAE-Zellulose erfolgen. Bei Äquilibrierung mit 0,2 m Phosphatpuffer vom pH 6,8 wird das a-Lipovitellin zurückgehalten, während das ß-Lipovitellin ungehindert durchläuft. Das a-Lipovitellin kann mit Puffer grösserer Ionenstärke eluiert werden. (Radomski und Cook, 1964).

Um die Eigenschaften des isolierten Lipoproteins mit den 3 Lipoproteinen des Eigelbs zu vergleichen, wurde die Vorschrift von Bernardi und Cook (1960) nachgearbeitet. Von den Proteinen der "low-density-fraction" unterscheidet sich das isolierte Lipoprotein durch seine Löslichkeitseigenschaften. Keines dieser Proteine ist durch Verdünnen seiner Lösung in Puffer mit destilliertem Wasser wieder auszufällen. Demnach scheidet eine Identität mit dem LDF-Lipoprotein Lipovitellenin aus. Für die "high-density-fraction" (a- + ß-Lipovitellin) ergaben sich die gleichen Löslichkeitseigenschaften wie für das isolierte Lipoprotein, und so war noch das Vorliegen von a- oder ß-Lipovitellin oder eines Gemisches beider zu prüfen. Abbildung 4 zeigt das Verhalten des isolierten Lipoproteins an DEAE-Zellulose. Es wird unter den angegebenen Bedingungen nicht adsorbiert und nur Spuren von Protein sind mit Puffer grösserer Ionenstärke eluierbar.

Diese Ergebnisse machen die Identität des isolierten Proteins mit ß-Lipovitellin wahrscheinlich. Eine Diskrepanz besteht allerdings im Lipidgehalt, der von Radomski und Cook zu 16% angegeben wird. Nun ist aber der Lipidgehalt eines Lipoproteins kein gutes Charakteristikum, und die von Radomski und Cook

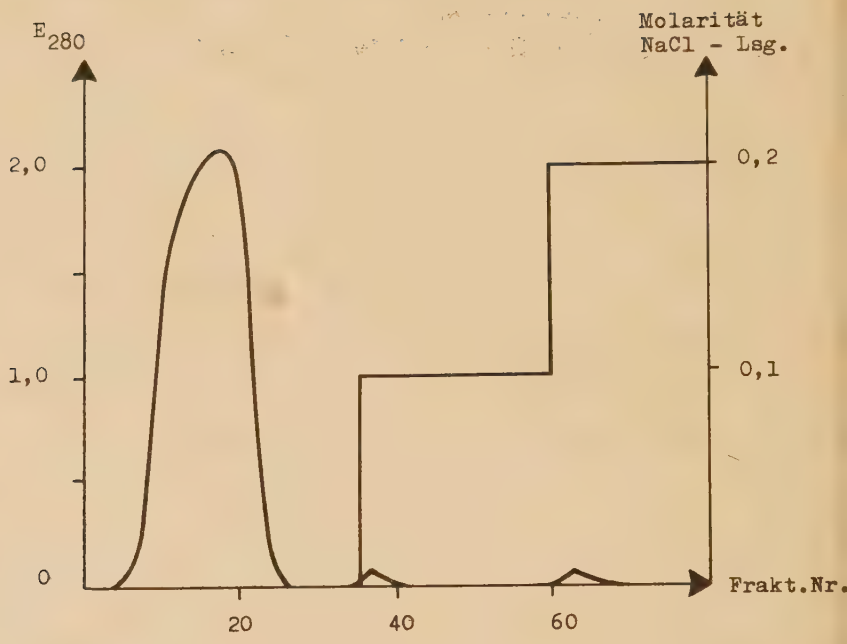

Abb. 4 : Chromatografie des Lipoproteins an DEAE-Zellulose. Säule: 2 x 16 cm. Puffer: 0,2 m Phosphat pH 6.8.Molarität des Puffers an NaCl 0 - 0,2 m (Treppenkurve).

angegebenen Werte sind nach Säulenchromatografie und ausgiebiger Dialyse des Proteins bestimmt. Eine genaue Analyse des Lipidanteils des β-Lipovitellins liegt nicht vor. Lediglich der Phosphatidgehalt wird nach der Phosphatbestimmung des Lipid-

anteils mit 62% angegeben. Demnach unterscheidet sich das isolierte Lipoprotein vom β-Lipovitellin durch seinen höheren Gehalt an Neutralfetten und ähnelt in seiner Lipidzusammensetzung mehr dem Gesamt-Lipid des Eigelbs, wie aus Tabelle 8 ersichtlich ist. Möglicherweise liegt hier eine Assoziation von Triglyceriden an die Phosphatide des β-Lipovitellins vor, die zur elektrostatischen Bindung an die Aminosäuren des Proteins befähigt sind (Kavanau, 1965).

Tabelle 8 : Zusammensetzung des Lipidanteils des Lipoproteins, β- Lipovitellins und Eigelbs.

	Lipidgehalt (bezogen auf Trockengew.)	Triglceride (%)	Phosphatide (%)	Cholesterin (%)
Lipoprotein	85 %	73,9	22,6	3,5
β-Lipovitellin (Radomski und Cook,1964)	16,5%	38	62	
Eigelb (Hawke und Lea, 1953)	61-71%	57,5	38	4,5

i. Abbau des Lipoproteins mit Phospholipase C.

Die Form der Lipoproteinteilchen muss man sich wohl derart vorstellen, dass die Neutralfette im Innern von den Phospholipiden und diese wiederum von der Proteinschicht umhüllt sind. Da der Proteinanteil des Lipoproteins sehr niedrig liegt (7-8% des TG), ist für die Teilchen eine Kugelform anzunehmen, weil bei der Kugel im Vergleich mit allen anderen geometrischen Körpern das Verhältnis von Oberfläche zu Volumeninhalt am kleinsten ist. Es ist aber auch eine Beteiligung der polaren Gruppen der Phospholipide an der zur Umhüllung der Neutralfette erforderlichen hydophilen Aussenschicht zu diskutieren. Um diese Frage zu untersuchen, wurde ein Abbauversuch mit Phospholipase C unternommen. Dieses Enzym (EC 3.1.4.3.) spaltet Phosphatide an der Bindung zwischen Amin und Glycerin, setzt also z.B. aus Lecithin Cholinphosphat frei. Die Reaktion kann durch Phosphatbestimmung nach Hydrolyse der phosphorylierten Amine verfolgt werden.

Tabelle 9 zeigt den Phosphatgehalt des Lipoproteins sowie die gefundene Freisetzung von Phosphat durch Phospholipase C. Ein Vergleich der Prozentzahlen lässt erkennen, dass bereits nach 10 min. 58% des gesamten Phosphats des Lipoproteins freigesetzt wurden. Dieses Ergebnis ist nur dadurch zu erklären, dass die polaren Gruppen der Phospholipide grösstenteils in der Aussenschicht der Teilchen liegen und somit für den Angriff der Phospholipase frei zugänglich sind.

Tabelle 9 : Phosphatgehalt von Lipoprotein und Freisetzung durch Phospholipase C.

a) Gesamtphosphat.	mg	%
Einwaage	1876	
Auswaage	934,6	
Trockengewicht		49,8
Phosphat (PO_4^{3-})	40,0	4,28(bez.auf TG.)

b) Freigesetztes Phosphat.

	mg	%
Einwaage	52,3	
= mg TG	26,05	
Phosphat nach 10 min	0,651	2,50 (bez.auf TG)
Phosphat nach 20 min	0,650	2,50 "
Phosphat nach 30 min	0,710	2,72 "

4. Bestimmung der Inhibitionsindices von Boromycin - Phytol und Boromycin - Lipoprotein, Reversibilität der Hemmung.

Der Inhibitionsindex ist definiert als das Verhältnis der Konzentrationen von Antimetabolit und Metabolit, bei dem ein Wachstum des Testorganismus gerade noch möglich ist. (Woolley, 1952).

Abbildung 5 zeigt die Aufhebung der Boromycinwirkung im Biophotometer durch Phytol und Lipoprotein. Das Molekulargewicht des Boromycins beträgt 860, das des Phytols 296,5. Daraus ergibt sich nach obiger Definition ein Inhibitionsindex von 0,02. Legt man bei der Berechnung für das Lipoprotein das durch Gelfiltration ermittelte Mindest-Molekulargewicht von 400 000 zu Grunde, so beträgt der Inhibitionsindex in diesem Fall 1.

Diese Werte zeigen, dass das Phytol ein unspezifischer Antagonist des Boromycins ist im Gegensatz zum Lipoprotein, das im stöchiometrischen Verhältnis wirkt.

Gleichzeitig ist aus Abbildung 5 ersichtlich, dass die Boromycinwirkung reversibel ist und zu keiner sofortigen Abtötung der Zelle führt.

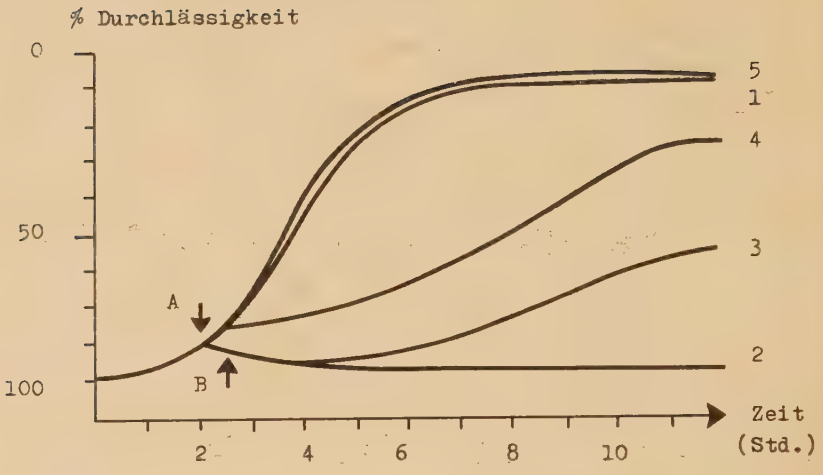

Abb. 5 : Aufhebung der Boromycinwirkung durch Phytol und Lipoprotein im Biophotometer.

A: Zusatz von Boromycin, B: Zusatz von Phytol oder Lipoprotein. 1: Kontrolle. 0,1 µg Boromycin/ml bei 2, 3, 4 u.5. 100 µg Phytol/ml bei 4.40 µg Lipoprotein/ml bei 3 und 400 µg/ml bei 5.

5. Wechselwirkung des Boromycins mit Phytol und Lipoprotein.

Für die Wechselwirkung eines Antibiotikums mit seinen Antagonisten ist neben der Wechselwirkung in der Zelle auch eine Bindung oder Reaktion der beiden Substanzen bereits ausserhalb der Zelle in Betracht zu ziehen.

a) Wechselwirkung Boromycin - Phytol.

Eine chemische Reaktion des neutralen Antibiotikums Boromycin mit dem langkettigen Alkohol Phytol ist schwer vorstellbar.

Um diese Möglichkeit auszuschliessen, wurde eine Mischung von Boromycin mit Phytol auf Kieselgelplatten in verschiedenen Lösungsmittelsystemen unterschiedlicher Polarität untersucht und die Rf-Werte mit denen der einzeln aufgetragenen Referenzsubstanzen verglichen. Tabelle 10 zeigt die verwendeten Lösungsmittelsysteme und die damit gefundenen Rf-Werte. Eine Veränderung der Rf-Werte von Boromycin und Phytol in der Mischung konnte in keinem Fall beobachtet werden.

Weiterhin wurden die IR-Spektren von Boromycin und Phytol, gelöst im Tetrachlorkohlenstoff, verglichen mit dem IR-Spektrum der Mischung der beiden Substanzen im selben Lösungsmittel. Tetrachlorkohlenstoff eignet sich für eine solche Untersuchung, da die absorbierenden Bereiche der beiden Substanzen in den "Fenstern" der Eigenabsorption des Lösungsmittels liegen.

Der Vergleich zeigt eine exakte Überlagerung der Spektren der Einzelsubstanzen zu dem Spektrum der Mischung (Abbildung 6).

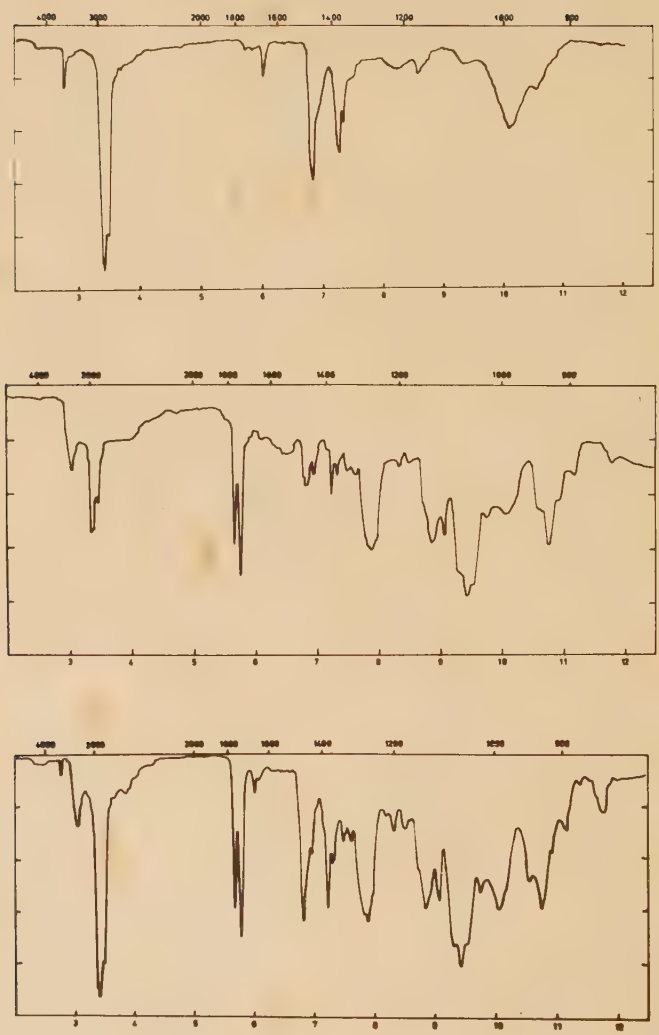

Abb. 6 : Infrarotspektren von Phytol (oben), Boromycin (Mitte) und Phytol + Boromycin (unten) in CCl_4. Konzentration der Substanzen jeweils 10 mg/ml. Schichtdicke der Küvetten 0,5 mm.

Tabelle 10 : Rf- Werte von Boromycin und Phytol in verschiedenen Lösungsmittelsystemen. Untersuchung der Wechselwirkung.

Lösungsmittel	Rf-Wert Boromyc.	Rf-Wert Phytol	Rf-Werte Mischung Boromyc.	Phytol
n-Hexan / H_2O (Oberphase)	0	0	0	0
Chloroform	0	0,58	0	0,58
Essigester	0,92	0,81	0,92	0,81
n-Butanol / NH_3 (4:1)	0,97	0,95	0,97	0,95
n- Butanol/ H_2O (Oberphase)	0,96	0,95	0,96	0,95
n-Butanol/Eisessig/H_2O (3:2:1)	0,98	0,95	0,98	0,95
Methanol	0,89	0,82	0,89	0,82
Methanol/ H_2O (4:1)	0,73	0	0,73	0

b) Wechselwirkung Boromycin - Lipoprotein.

Eine "Reaktion" bzw. Bindung des Boromycins an das Lipoprotein war auf Grund der Löslichkeitseigenschaften des Antibiotikums schwierig nachzuweisen.
Gibt man in Alkohol gelöstes Boromycin zu Wasser bis zu einer Konzentration von 10 µg/ml, so ist das Antibiotikum darin offenbar kollodial verteilt. Der Hemmhofdurchmesser und damit der Antibiotikumgehalt einer solchen Lösung nimmt ab, wenn man sie einige Stunden bei 30 000 U/min. (70 000 g) zentrifugiert. Gibt man die Boromycinlösung auf einen Sucrosegradienten und untersucht das Sedimentationsverhalten in der Ultrazentrifuge, so ist das Boromycin nach dem Lauf über den ganzen Gradienten "verschmiert". Daher ist es nicht verwunderlich, dass Bindungs-

versuche mittels Gelfiltration und Kompensationsdialyse fehlschlugen. Bei der Gelfiltration kommt das Boromycin nicht mehr von der Säule, und von Dialysierschlauch wird es ebenfalls adsorbiert. Mit der Ultrazentrifuge konnten Bindungsversuche nicht angestellt werden, da das Lipoprotein nicht sedimentiert.

Der Nachweis einer Bindung gelang schliesslich durch Auflösen des Lipoproteins in einer boromycinhaltigen Pufferlösung und anschliessende Ausfällung durch Verdünnen. Der in dieser Lösung mit dem Plattendiffusionstest bestimmte Boromycingehalt nimmt stärker ab als der der entsprechend verdünnten Vergleichslösung. Diese Bindung ist kein Extraktionseffekt im nach dem Ausfällen bestehenden Zweiphasensystem, denn eine solche Bindung kann mit anderen, ebenfalls nicht wasserlöslichen Antibiotika (z.B. Borrelidin) nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 11 zeigt die Abhängigkeit der gebundenen Menge Boromycin von der Menge zugesetzten Lipoproteins.

Tabelle 11 : Bindung von Boromycin an Lipoprotein. Zusatz des Lipoproteins zu 10 ml Pufferlösung mit 10 µg Boromycin/ml. Ausfällung durch Zusatz von 20 ml H_2O.

	Zugesetztes Lipoprotein in mg			
	0	8	80	160
Molares Verhältnis Lipoprotein/Boromycin	0	0,1	1	2
Hemmhofdurchmesser nach Ausfällen (mm)	17,5	15,0	9,5	0
µg Boromycin gebunden	0	28	67	100
µg Boromycin / mg Lipoprotein	0	3,5	0,84	0,63

Aus dem ausgefällten Lipoprotein ist das Boromycin wieder extrahierbar. Spaltet man die Lipide durch Extraktion mit Methanol ab und verteilt sie zwischen Methanol und Petroläther, so ist das Boromycin in der Methanolphase mit dem Plattendiffusionstest nachzuweisen.

6. Modell der Wechselwirkung.

Gibt man im Biophotometer zu einer wachsenden Kultur von Bacillus subtilis grössere Mengen Phytol (1 mg/ml), so steigt die optische Dichte wegen der Unlöslichkeit des Phytols in Wasser sofort an. Die Steigung der Wachstums - kurve sinkt dagegen stark ab und erreicht erst nach einiger Zeit wieder den ursprünglichen Wert. Macht man den analogen Versuch mit einer grösseren Menge Lipoprotein (1 mg/ml), so steigt zwar ebenfalls die optische Dichte an, die Steigung der Wachstumskurve bleibt aber unverändert.

Abbildung 7 zeigt den besprochenen Verlauf der Wachstumskurven bei Phytol- und Lipoproteinzusatz.

Bei Zusatz von Lipoprotein wird die Wachstumskurve nur parallel verschoben, das heisst das Protein wird von den Zellen nicht resorbiert. Die getrennte Darstellung der Kurven 3a u. b. in Abbildung 7 verdeutlicht dagegen das Zustandekommen des Kurvenverlaufes bei Zusatz von Phytol. Die gestrichelte Kurve 3b deutet den Verlauf der Wachstumskurve an, wie er ohne Zusatz von Phytol aussehen würde, nämlich gleich dem der Kontrolle. Die durchgezogene Kurve 3 gibt aber den tatsächlichen Verlauf nach Zusatz von Phytol wieder. 3 entsteht aus 3b durch Überlagerung einer anderen Kurve. Die Form dieser Kurve 3a, nämlich der durch das Phytol zusätzlich zur Lichtabsorption der Kultur verursachten Absorption, ergibt sich durch Subtraktion der durch den Kontrollwert gegebenen

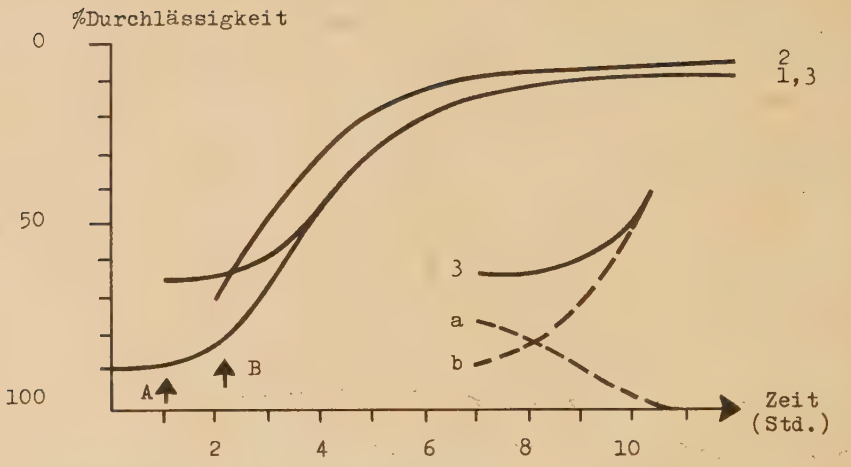

Abb. 7: Einfluss von Phytol und Lipoprotein auf die Wachstumskurve von Bacillus subtilis. Biophotometerversuch.

A: Zusatz von Phytol, B: Zusatz von Lipoprotein. 1:Kontrolle 2: 1 mg Lipoprotein/ml. 3: 1 mg Phytol/ml. Erläuterung zu 3 a und b siehe Text.

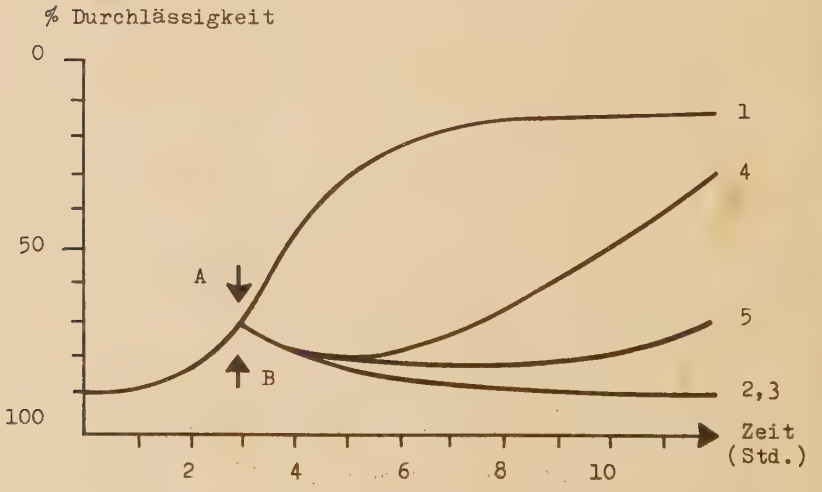

Abb. 8 : Untersuchung der Additivität der antagonisierenden Wirkung von Phytol u.Lipoprotein. Biophotometerversuch.

A: Zusatz von Boromycin, B:Zusatz von Phytol und Lipoprotein. 1: Kontrolle.0,1 µg Boromycin/ml bei 2,3,4 u.5. 1 µg Phytol/ml bei 3 u.5. 40 µg Lipoprotein/ml bei 4 u. 5.

Lichtabsorption (3b) von der gemessenen Absorption nach Phytolzusatz (3). Da die Kurve 3a einen abfallenden Verlauf zeigt, kann daraus auf eine Aufnahme des Phytols in die Zelle geschlossen werden. Zusammen mit den Ergebnissen von III, 4 ergibt sich folgendes Bild: Phytol, der unspezifische Antagonist des Boromycins, wird von der Zelle resorbiert und ein grosser Überschuss verdrängt das Antibiotikum von seiner Haftstelle. Das Lipoprotein dagegen kann auf Grund seiner Grösse nicht in die Zelle eindringen und bindet das Boromycin ausserhalb der Zelle.

Auf Grund dieser Vorstellung der Wechselwirkung lässt sich voraussagen, dass Phytol mit Boromycin nicht nur in der Zelle um die Haftstelle konkurrieren sollte, sondern auch am Lipoprotein. Um diese Voraussage zu prüfen, wurde im Biophotometer untersucht, ob die Aufhebung der Boromycinwirkung additiv ist oder nicht.

Phytol in einer Konzentration, bei der es selbst noch keine Aufhebung der Hemmung durch Boromycin bewirkt, wurde gleichzeitig mit der Menge Lipoprotein zugesetzt, die das Wachstum unter den gegebenen Bedingungen gerade noch ermöglicht. Abbildung 8 lässt erkennen, dass mit Phytol beladenes Lipoprotein das Boromycin schlechter zu binden vermag, die Aufhebung der Hemmung erfordert längere Zeit. Aus diesem Versuch lässt sich folgern, dass die Bindungsstellen für das Boromycin am Lipoprotein und in der Zelle ähnlich sind. Oder, mit anderen Worten, dass das Boromycin in der Zelle ebenfalls an ein Lipoprotein gebunden wird.

7. Kreuztest und Bindung verschiedener Antibiotika mit Lipoprotein.

Als nächster Schritt war die Frage zu klären, ob die Bindung des Boromycins an das Lipoprotein einen Sonderfall darstellt, oder ob noch andere Antibiotika diese Bindung zeigen. Even-

tuell wäre von der Bindung von Antibiotika mit bekannter Wirkungsweise ein Hinweis auf den Angriffspunkt des Boromycins zu erhalten.

Tabelle 12 zeigt die untersuchten Antibiotika, geordnet nach ihrer Wirkungsweise (Gottlieb u. Shaw, 1967), sowie den Einfluss des Lipoproteins auf ihre Wirkung. In die Untersuchung wurden auch Detergentien einbezogen, da auf Grund der Aufhebbarkeit der Boromycinwirkung durch oberflächenaktive Stoffe vermutet wurde, dass die Wirkung zu dieser Stoffklasse in irgendeiner Beziehung stehen könnte. Das Ergebnis zeigt deutlich, dass ein Zusammenhang zwischen der Aufhebbarkeit der Wirkung von Antibiotika durch Lipoprotein und deren Angriffspunkt in der Zelle besteht. Demnach ist auch für das Boromycin ein Angriffspunkt in der Cytoplasmamembran zu postulieren, und die Vermutung, dass Boromycin in der Zelle an ein Lipoprotein gebunden wird, steht in guter Übereinstimmung mit dieser These.

Parallel mit der Aufhebung im Kreuztest geht anscheinend auch die Bindung an das Lipoprotein. Auf Grund der schlechten Löslichkeitseigenschaften und zu kleiner Hemmzonen konnte die Bindung nicht bei allen diesen Antibiotika geprüft werden.

Die Bindung des Polymyxins kommt dadurch zustande, dass das Lipoprotein durch die Einwirkung des Antibiotikums denaturiert. Das gleiche gilt für das synthetische Detergens Cetyltrimethylammoniumbromid. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Newton (1956), der die Wirkung des Polymyxins auf seine Eigenschaften als kationisches Detergens zurückführte.

Tabelle 12 : Kreuztest und Bindung verschiedener Antibiotika mit Lipoprotein.

Zusatz von 100 mg Lipoprotein zu 10 ml Pufferlösung mit 5 - 200 µg Antibiotikum/ml. Ausfällen des Lipoproteins durch Zusatz von 20 ml H_2O.

Zeichenerklärung:

+ : Aufhebung durch Lipoprotein im Kreuztest.
- : Keine Aufhebung im Kreuztest.
c : Konzentration des Antibiotikums in der Pufferlösung in µg/ml.
A : Hemmhofdurchmesser der Referenzlösung nach Verdünnen in mm.
B : Hemmhofdurchmesser der Antibiotikumlösung nach Ausfällen des zugesetzten Lipoproteins.
A-B : Differenz der Hemmhofdurchmesser. Ein positiver Wert zeigt die Bindung des Antibiotikums an.

Wirkungsort u. Antibiotika	Kreuztest	c	A	B	A-B
Zellwandsynthese					
Cycloserin (Harned u.a.1955)	-	100	25	25	0
Penicillin (Fleming 1946)	-	5	33	33	0
Vancomycin (McCormick u.a.1955)	-	10	13,1	13,3	-0,2
Nucleinsäure- und Purinstoffwechsel					
Actinomycin C_3 (Brockmann und Gröne 1954)	-	5	23	23	0
Phleomycin (Maeda u.a.1956)	-	10	22	22	0
Azaserin (Stock u.a.1954)	-	50	23	23	0
Zellatmung					
Patulin (Luijk 1938)	-	100	16	16	0

Wirkungsort und Antibiotika	Kreuztest	c	A	B	A-B
Proteinsynthese					
Borrelidin (Berger u.a.1949)	-	50	16	16	0
Chloramphenicol (Gottlieb u.a.1948)	-	50	16	16	0
Erythromycin (McGuire u.a.1952)	-	10	24	24	0
Fusidinsäure (Godtfredsen u.a.1962)	-	10	28	29	-1
Lankamycin (Gäumann u.a.1960)	-	100	16,5	16	0,5
Neomycin (Waksman u. Lechevalier 1949)	-	20	17,5	14	3,5
Oxytetracyclin (Finley u.a.1950)	-	10	25	25	0
Puromycin (Porter u.a.1952)	-	200	15	15	0
Streptomycin (Waksman 1952)	-	100	12	12	0
Cytoplasmamembran					
Enniatin A (Gäumann u.a.1947)	+	100	12	10	2
Enniatin B (Gäumann u.a.1947)	+	100	-	-	-
Gramicidin D (Dubos 1939)	+	100	-	-	-
Gramicidin S (Gauze u. Brazhnikova 1943)	+	?	19	16	3
Nonactin (Corbaz u.a.1955)	+	10	8	6	2
Polymyxin B (Benedict u. Langlykke 1947)	+	100	15	12	3
Valinomycin (Brockmann u.Schmidt-Kastner 1955)	+	100	10	7	3
Cetyltrimethylammoniumbromid	+	100	24	10,5	13,5
Dodecylsulfat -Na	-	20000	15	-	-
Desoxycholat -Na	-	1000	14	-	-

Die Bindung an die anionischen Detergentien Natrium-Dodecylsulfat und Natriumdesoxycholat war nicht zu bestimmen, da das Lipoprotein nach Zusatz dieser Detergentien nicht mehr durch Verdünnen ausfällbar ist. Anscheinend erfolgt eine Spaltung in Untereinheiten, wie sie für die Wirkung von anionischen Detergentien auf Membranproteine beschrieben worden ist. (Engelman u.a., 1967).

8. Bindung von Boromycin an ganze Zellen und an isolierte Membranfragmente von Bacillus subtilis.

Um die Vermutung einer Bindung des Boromycins an die Cytoplasmamembran zu untermauern, wurden analog den Bindungsversuchen von Newton für Polymyxin (Newton 1954; Few und Schulman, 1953) die Bindungsverhältnisse des Boromycins bei ganzen Zellen und isolierten Membranproteinen verglichen. Diese Versuche wurden ähnlich wie die Bindungsversuche an das isolierte Lipoprotein aus Eigelb durch die Löslichkeitseigenschaften des Boromycins erschwert. Eine Eichkurve für den Boromycingehalt in wässriger Lösung (bestimmt mit dem Plattendiffusionstest) ergab nur bis zu einer Boromycin-Konzentration von 10 µg/ml eindeutige Resultate. Darüberhinaus war praktisch keine Vergrösserung der Hemmhofdurchmesser mehr festzustellen.

Tabelle 13 zeigt die Bindung des Boromycins an ganze Zellen in Abhängigkeit von der Boromycinkonzentration. Zum Vergleich war nun die Bindungskapazität der Membranproteine zu bestimmen. Das Membransystem grampositiver Bakterien lässt sich auf relativ einfache Art durch Abbau der Zellwand mit Lysozym (E.C.3.2.1.17) und Lyse der entstehenden Protoplasten isolieren (Weibull,1953). Die nach dieser Methode gewonnene partikuläre Fraktion enthält aber ausser den Proteinen der Cytoplasmamembran noch die des internen Membransystems, die Mesosomen (Salton und Freer, 1965). Eine Trennung der beiden Membransysteme ist mit den heute zur Verfügung stehenden Methoden nicht möglich.

Tabelle 13 : Bindung von Boromycin an Zellen von Bacillus subtilis.

10 ml Boromycinlösung versetzt mit 0,5ml Zellsuspension. Trockengewicht der Zellsuspension 9,8 mg/ml. Boromycinbestimmung im Überstand nach Zentrifugieren.

Boromycin (µg/ml)	Hemmhof Eichkurve(mm)	Hemmhof nach Zentrifugieren (mm)	µg Boromyc. gebunden	µg Boromycin / mg Zelle
2	11,5	11,0	6	1,2
4	17,4	13,3	8	1,6
6	21,0	17,3	10	2,0
8	24,0	18,8	21	4,3
10	25,0	22,0	22	4,5

Die nach der Methode von Salton und Freer (1965) isolierten Membranproteine wurden für die Bindungsversuche eingesetzt. Wegen der schlechten Löslichkeit des Boromycins, zu der noch die Unlöslichkeit der Membranproteine hinzukommt, wurde die Bindung nur bei einer Boromycinkonzentration von 10 µg/ml untersucht (Tabelle 14). Der gefundene Wert von 1,28 µg Boromycin/ mg Protein liegt niedriger als die Bindungskapazität der Gesamtzelle. Durch vorherige Ultraschallbehandlung (1 min) der Membranproteine steigt dieser Wert aber beträchtlich an, verursacht durch die Oberflächenvergrösserung der Partikel, und nähert sich dem Wert für die Bindungskapazität der Gesamtzelle. Eine Differenz der beiden Werte ist also wohl auf die unterschiedliche Grösse der adsorbierenden Oberfläche zurückzuführen.

Durch diesen Vergleich der Bindungskapazitäten konnte wahrscheinlich gemacht werden, dass die Cytoplasmamembran und die Mesosomen die Boromycin-bindenden Strukturen der Zelle darstellen. Ein Beweis ist aber nur durch die Verfolgung des Weges des Boromycins in der Zelle zu erbringen.

Tabelle 14 : Bindung von Boromycin an Membranproteine.

20 ml Boromycinlösung mit 10 µg/ml (Hemmhof 24 mm) versetzt mit Membranproteinen. Boromycinbestimmung im Überstand nach Zentrifugieren. Trockengewichtsbestimmung der Membranproteine mit dem Sediment.

Membranprotein in mg (TG)	Hemmhof des Überstandes (mm)	µg Boromycin gebunden	µg Boromycin/ mg Protein
109,4	13,7	140	1,28
76,1 (mit US behand,)	13,5	144	1,88

9. Verfolgung der Boromycinbindung in der Zelle.

Der Borgehalt des Boromycins, der praktisch eine Markierung darstellt, sollte es ermöglichen, den Weg des Antibiotikums in der Zelle zu verfolgen. Allerdings erfordern die eingangs erwähnten Schwierigkeiten bei der Borbestimmung (Koch und Koch, 1964) eine relativ hohe Konzentration an Boromycin, dessen Borgehalt ja nur bei 1,27% liegt. Als geeignet unter den gegebenen Bedingungen erwies sich die Bestimmung mit Carminsäure (Smith u.a.1955). Die Empfindlichkeit dieser Bestimmung ist nicht so gross, dass der Leerwert durch die vom Glas abgegebenen Spuren von Borat beeinflusst wird, und weiter ist die Störung durch Salze relativ gering, so dass auf eine Abtrennung des Borats als Borsäuremethylester verzichtet werden konnte.

Tabelle 15 zeigt die Borbestimmung in den Zellfraktionen nach Boromycinzusatz.

Etwa 80% des aufgenommenen Boromycins werden danach von der partikulären Fraktion, also Cytoplasmamembran und Mesosomen, gebunden. Damit ist der aus den Kreuztestversuchen abgeleitete Bindungsort des Boromycins im Membransystem nachgewiesen.

Tabelle 15 : Ermittlung der Verteilung des Boromycins in der Zelle durch Bestimmung des Borgehaltes der einzelnen Zellfraktionen.

2 g Zellen (Frischgewicht) in 100 ml definiertem Medium versetzt mit 1 mg Boromycin (= 12,7 µg Bor). Nicht adsorbiertes Boromycin mit dem Plattendiffusionstest bestimmt.

Fraktion	µg Bor	= µg Boromycin
Nicht adsorbiertes Boromycin		500
Aufgelöste Zellwand und Protoplasma	1,2	94
Cytoplasmamembran und Mesosomen	5,1	400

		994

10. Untersuchung einer möglichen detergensartigen Wirkung des Boromycins.

Die Wirkung der Antibiotika, die an der Cytoplasmamembran angreifen, wird oft fälschlicherweise mit der Schädigung durch Detergentien gleichgesetzt. Gegen eine detergensähnliche Wirkung des Boromycins sprechen aber zahlreiche Befunde, die eine Analogie mit diesen Substanzen ausschliessen. Die niedrigste Hemmkonzentration des Boromycins liegt mit 0,05 µg/ml noch 3 Zehnerpotenzen niedriger als die Hemmkonezentration des Polymyxins bei Bacillus subtilis (50 µg/ml). Das Polymyxin ist eines der wenigen Beispiele für Antibiotika mit detergensähnlicher Wirkung (Newton 1956). Die Hemmkonzentration der synthetischen Detergentien wiederum liegt noch einige Zehnerpotenzen über der Hemmkonzentration des Polymyxins.

Die Hemmung durch Boromycin ist noch nach Stunden reversibel, während die Wirkung der Detergentien zu einem Zusammenbrechen der gesamten Membranfunktionen führt. Von den synthetischen

Detergentien Cetyltrimethylammoniumbromid, Dodecylsulfat und Desoxycholat, die als Beispiel für kationische und anionische Detergentien ausgewählt wurden, zeigt nur das Cetyltrimethylammoniumbromid die Aufhebung durch Lipoprotein, die aber auf einer Denaturierung beruht. Nichtionische Detergentien, wie z.B. Tween 80, zeigen gar keine Hemmung von Bacillus subtilis. Die Wechselwirkung des Boromycins mit dem Lipoprotein führt aber weder zu einer Denaturierung des Proteins noch zur Spaltung in Untereinheiten wie bei Dodecylsulfat und Desoxycholat.

11. Verfolgung der Synthese von Protein, RNS und DNS in vivo sowie der Atmung unter dem Einfluss von Boromycin.

Nachdem der Bindungsort des Boromycins in der Zelle nachgewiesen war, stellte sich die Frage nach der Art der Wirkung des Antibiotikums. Für den anfangs vermuteten Zusammenhang zwischen Borstoffwechsel und Boromycinwirkung ergaben orientierende Versuche keinen Hinweis. Diese negativen Resultate mögen durch die ungenügende Kenntnis der biologischen Rolle des Bors bedingt sein und schliessen einen Zusammenhang letztlich nicht aus. Andererseits muss dieser Zusammenhang natürlich nicht gegeben sein, und so wurde versucht, durch Verfolgung der Synthese von Protein, RNS und DNS sowie des Sauerstoffverbrauchs einer in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen Kultur von Bacillus subtilis einen Anhaltspunkt für die Wirkungsweise des Boromycins zu bekommen.

Aus Abbildung 9 ist zu ersehen, dass die Syntheseleistungen ziemlich einheitlich blockiert werden. Für alle diese Synthesewege ist ein Ablauf an oder in der Membran berichtet worden (Schlesinger, 1963; Nielsen und Abrams, 1964; Ganesan und Lederberg, 1965), so dass die gleichzeitige Hemmung durch ein an der Membran angreifendes Antibiotikum kein Widerspruch ist. Andererseits ist aber bei Antibiotikawir-

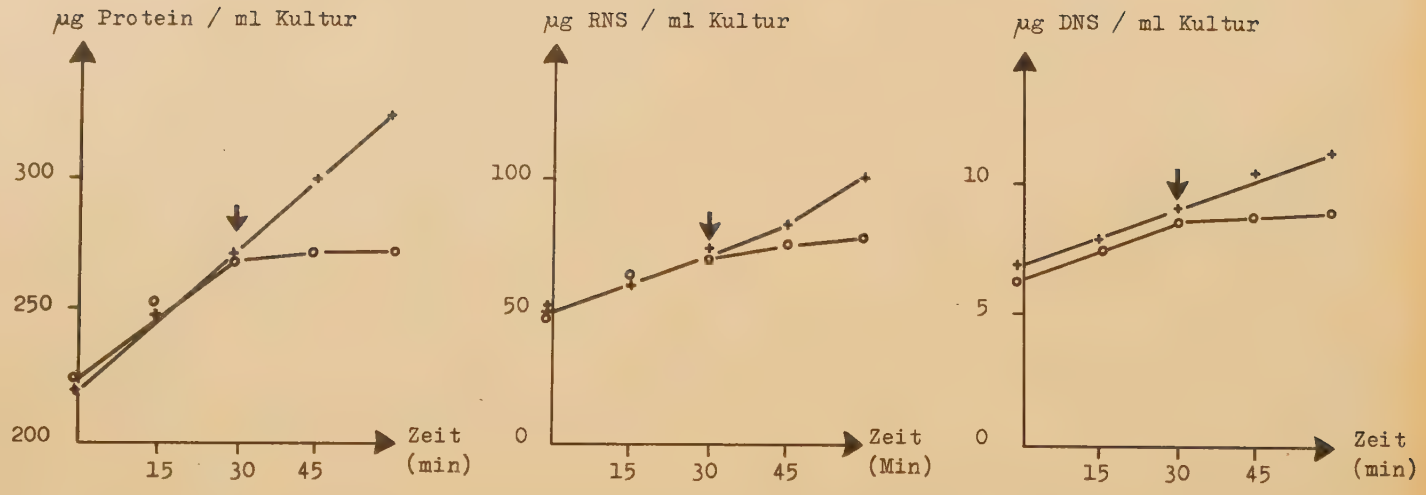

Abb. 9 : Verfolgung der Synthese von Protein, RNS und DNS nach Boromycinzusatz. Definiertes Medium, 37°. Optische Dichte der Kultur bei 578 nm 0,3 - 0,8. Pfeil: Zeitpunkt der Zugabe des Boromycins (0,05 µg/ ml). o : Kurven mit Boromycinzusatz. + : Kontrollen.

kungen in vivo sehr schwer zwischen einem Primär- und einem Sekundär-Effekt zu unterscheiden. Eine Schlussfolgerung ist aus diesen Versuchen daher wohl nicht zu ziehen.

Abbildung 10 zeigt den Sauerstoffverbrauch einer Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase sowie die Veränderung der Sauerstoffaufnahme nach Boromycinzusatz. Es fällt auf, dass die Sauerstoffaufnahme nach Zusatz von 0,1 µg Boromycin/ ml noch eine Zeitlang ungehindert fortschreitet. Erst nach 10 min. tritt ein allmählicher Abfall ein. Vergleicht man damit die Wirkung des Boromycins im Biophotometer (Abbildung 1) so erkennt man, dass die Zunahme der Trübung sofort stagniert. Bei einer Boromycinkonzentration von 0,05 µg/ml, die nach der Biophotometerkurve nur eine Wachstumsverzögerung bewirkt, war im Warburgversuch innerhalb von 30 min. kein Abfall der Sauerstoffaufnahme festzustellen.

Die in den Abbildungen 1,9 und 10 dargestellten Ergebnisse lassen sich durch eine Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung interpretieren. Der Sauerstoffverbrauch läuft weiter, während das für Synthesen und das Wachstum unbedingt nötige energiereiche Phosphat nicht zur Verfügung steht. Im Einklang damit stände, dass die Atmungskette und damit die oxidative Phosphorylierung bei aerob wachsenden Bakterien ebenfalls im Membransystem lokalisiert ist. (Downey, 1964; Broberg und Smith, 1967).

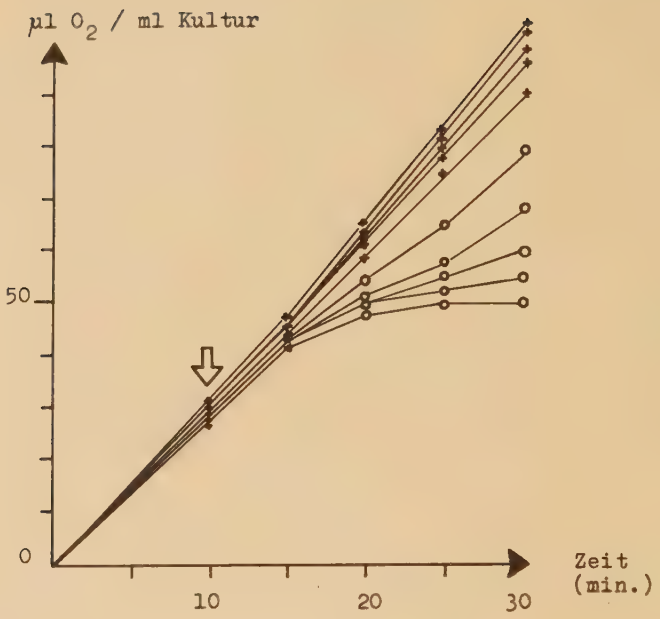

Abb. 10 : Sauerstoffverbrauch von Bacillus subtilis nach Boromycinzusatz.

Definiertes Medium, 37°, Dichte der Kultur bei 578 nm 0,3. Gasphase Sauerstoff, Füllung 2 ml Kultur pro Gefäss.

Pfeil: Zeitpunkt der Zugabe des Boromycins (0,1 µg/ml). +: Kontrollen. O: Kurven mit Boromycinzusatz.

12. Hemmung von Clostridium pasteurianum durch Boromycin und Einfluss des Antibiotikums auf die phosphoroclastische Reaktion.

Eine Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung bei aeroben Bakterien durch Boromycin sollte mit der Unempfindlichkeit von Anaerobiern parallel gehen, da deren Energie-

versorgung grundsätzlich anders abläuft. So deckt zum Beispiel Clostridium pasteurianum seinen Bedarf an energiereichem Phosphat durch die phosphoroclastische Reaktion, dem Abbau von Pyruvat zu Acetylphosphat unter der Mitwirkung von Ferredoxin. Aus Acetylphosphat kann der Phosphatrest unter Bildung von ATP auf ADP übertragen werden (Heer und Bachofen, 1966).

Aus Tabelle 16 ist zu entnehmen, dass die Hemmkonzentration des Boromycins bei Clostridium pasteurianum in der gleichen Grössenordnung liegt wie bei Bacillus subtilis.

Tabelle 16 : Hemmung des Wachstums von Clostridium pasteurianum durch Boromycin. Definiertes Medium, Temperatur 30°.

Konzentration an Boromycin (µg/ml)	Extinktion (578 nm) nach 20 Std.
0	5,00
0,05	1,25
0,1	0,40
1,0	0,30

Eine Hemmung des leicht in vitro zu untersuchenden phosphoroclastischen Systems durch Boromycin konnte aber nicht nachgewiesen werden. Tabelle 17 zeigt die gefundenen Werte.

Tabelle 17 : Beeinflussung der Phosphoroclastischen Reaktion im zellfreien Extrakt von Clostridium pasteurianum durch Boromycin.

Inkubation 10 min. bei 30°. Reaktionsansatz und Bestimmung nach II, 11 b.

Konzentration an Boromycin (µg/ml)	µmol Acetylphosphat/ mg Protein
0	1,60
0,1	1,61
1,0	1,59
10,0	1,62

Ein letzter Anker für die These der Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung wäre eine ATP-spaltende Aktivität des Boromycins. Aber auch hier war das Ergebnis negativ. (Untersuchung der ATP-Spaltung nach der für die Bestimmung der ATP-ase Aktivität angegebenen Vorschrift).

Diese Ergebnisse zeigen, dass der primäre Angriffspunkt für das Boromycin nicht in einer Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung zu suchen ist. Dieser Schluss setzt allerdings voraus, dass die Wirkung des Antibiotikums bei Bacillus subtilis und Clostridium pasteurianum in gleicher Weise erfolgt.

13. Aufhebung der Boromycinwirkung durch Kaliumionen.

Im Hinblick auf die These der Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung durch Boromycin war interessant festzustellen, dass für einige der im Kreuztest durch Lipoprotein aufhebbaren Antibiotika eine scheinbare Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien berichtet wird, die aber auf einer Beeinflussung des Ionentransports beruht (Pressman, 1965).

Valinomycin z.B. beeinflusst einerseits die Permeabilität für Kationen mit grosser Selektivität für Kaliumionen und erhöht andererseits die Aktivität der K^+-Na^+- aktivierbaren ATP-ase, die von vielen Autoren als die Pumpstruktur für den Kationentransport angesehen wird (Skou, 1967). Diese Kombination von Effekten führt zu einem zyklischen Ionenfluss, der das neu gebildete ATP sofort wieder verbraucht und somit die Erscheinung der Entkoppelung simuliert (Harris u.a.,1965). Für Valinomycin, Gramicidin und Nonactin wird ferner eine vollständige Aufhebung der Wirkung bei Streptococcus faecalis durch hohe Konzentrationen an Kaliumionen (0,2m) berichtet (Harold und Baarda, 1967; Harold und Baarda, 1968). Es war also naheliegend zu prüfen, ob das bei diesen Antibiotika

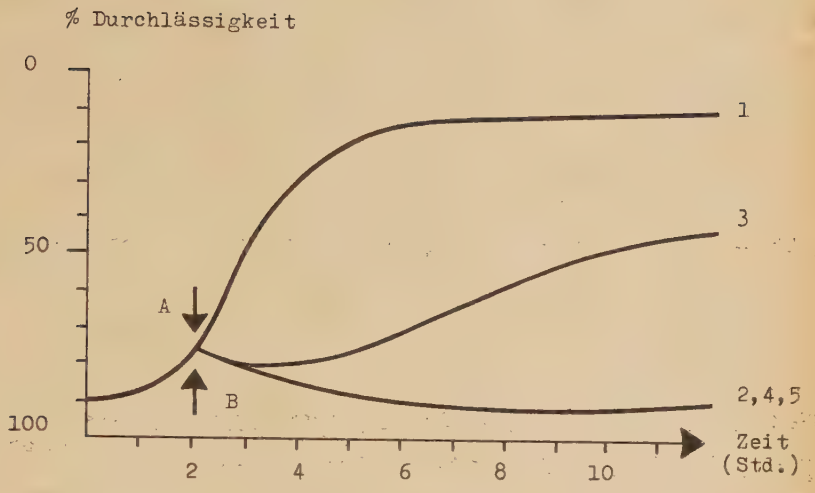

Abb. 11 : Aufhebung der Boromycinwirkung durch Kaliumionen. Biophotometerversuch.

A. Zusatz von Boromycin, B: Zusatz der Alkalisalze. 1: Kontrolle. 0,1 µg Boromycin/ml bei 2,3,4 u. 5. 3: 15 mg KCl/ml. 4: 11,7 mg NaCl/ml. 5: 10,5 mg NH_4Cl/ml.

und Boromycin gleiche Verhalten gegen Lipoprotein parallel geht mit einer Aufhebung der Wirkung durch Kaliumionen.

Aus Abbildung 11 ist ersichtlich, dass die Hemmung durch Boromycin bei Bacillus subtilis tatsächlich durch Kaliumionen aufhebbar ist, und dass diese Aufhebung spezifisch für Kaliumionen ist.

Die zur Aufhebung benötigte Konzentration an Kaliumionen steht in guter Übereinstimmung mit den Versuchen von Lubin und Ennis (1964), die die intrazelluläre Kaliumionenkonzentration bei Escherichia coli zu 0,2 molar bestimmten. Die zum Vergleich angestellten Untersuchungen mit Nonactin,

Polymyxin und Erythromycin ergaben für das Nonactin eine spezifische Aufhebung durch Kaliumionen, für das Polymyxin durch Kalium-, Natrium- und Ammonium-Ionen sowie für das Erythromycin keine Aufhebung. Die Aufhebung beim Polymyxin dürfte ein reiner Salzeffekt sein. Vermutlich verhindert der Überschuss an Kationen die Anlagerung des Polymyxins, das selbst als Kation wirkt, an die Membran. Das Erythromycin wurde als Beispiel eines nicht an der Membran adsorbierten Antibiotikums untersucht (Mao und Wiegand, 1968).

14. Beeinflussung des Kaliumstoffwechsels durch Boromycin.

Die Aufhebbarkeit der Boromycinwirkung durch Kaliumionen wirft die Frage nach dem spezifischen Angriffspunkt des Antibiotikums auf. Entweder beruht die Wirkung auf einer Permeabilitätsänderung der Membran oder der aktive Transport für diese Ionen wird beeinflusst.

a. Beeinflussung der Permeabilität für Kaliumionen.

Der Austritt von Kaliumionen aus in kaliumhaltigem Medium gezüchteten Zellen wurde nach der unter II,12 b beschriebenen Methode untersucht. Gefunden wurde ein Austritt von 40% des intrazellulären Kaliums (Tabelle 18), in einem Parallelversuch ein Austritt von 70%. Die unterschiedlichen Werte mögen durch unterschiedlichen physiologischen Zustand der Zellen bedingt sein, möglicherweise aber auch in der Methode begründet liegen, die wegen der äusserst geringen Kaliummengen nur begrenzte Genauigkeit besitzt.

Tabelle 18 : Kaliumgehalt von Bacillus subtilis und Kaliumaustritt bei Boromycinzusatz.
Ausführung siehe II 12 b.

Gesamt-Kalium:	Einwaage an Zellen (mg)	mg Kalium	% des TG
	48,8	0,0865	0,18

Kaliumaustritt :	Zellen in 50 ml Suspension (mg)	mg Kalium im Überstand	% des TG
	7,06	0,0055	0,079

b. Einfluss des Boromycins auf die Aktivität der K^+-Na^+-aktivierbaren ATP- ase der Membran.

Da der aktive Transport für Kaliumionen in vivo schwierig zu untersuchen ist, wenn die Permeabilität für diese Ionen erhöht ist, wurde der Einfluss des Boromycins auf die Aktivität der K^+-Na^+- aktivierbaren ATP-ase untersucht. Dieses Enzym (E.C.3.6.1.) stellt sehr wahrscheinlich die Ionentransportierende Struktur der Cytoplasmamembran dar (Skou, 1967). Im untersuchten Konzentrationsbereich, in dem Kaliumionen und Boromycin-Konzentration variiert wurden, konnte praktisch kein Einfluss des Antibiotikums auf das Enzym festgestellt werden. Tabelle 19 zeigt die gefundenen Aktivitätswerte.

Tabelle 19 : Aktivität der K^+-Na^+- aktivierbaren ATPase der Cytoplasmamembran von Bacillus subtilis unter dem Einfluss von Boromycin.

Ausführung nach II 12c. Aktivitätsangabe in µmol freigesetztes Phosphat/mg Protein / min.

µmol KCl pro Reaktionsansatz	µg Boromycin pro Reaktionsansatz	µmol Phosphat / mg Protein / min
10	0	0,0542
10	50	0,0522
10	500	0,0572
100	0	0,0548
100	50	0,0572
100	500	0,0602

c. Wirkungsweise des Boromycins.

Die Beeinflussung des Kaliumgehaltes der Zelle durch das Boromycin erfolgt also nur über eine Permeabilitätsbeeinflussung der Cytoplasmamembran und nicht über eine Blockierung des aktiven Transports. Allein der Abfall der intrazellulären Kaliumionen-Konzentration auf die Hälfte des normalen Wertes reicht aber aus, um die Stoffwechselvorgänge zum Erliegen zu bringen (Lubin, 1964).

Da der aktive Transport für Kaliumionen nicht blockiert wird, führt das Bestreben der Zelle, den normalen Kaliumionen-Spiegel aufrecht zu erhalten, zu einem zyklischen Ionenfluss und zu einem Verbrauch des energiereichen Phosphats, das nun nicht mehr für Syntheseleistungen zur Verfügung steht. Dadurch kommt es zur Erscheinung der Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung und letztlich zum Zelltod.

15. Permeabilitätsbeeinflussung durch Antibiotika - EMK- Messungen an synthetischen Membranen.

Die Beeinflussung der Permeabilität für Kaliumionen kann entweder durch die Bindung des Antibiotikums an eine Struktur in der Membran erfolgen, die ihrerseits am Aufbau der Permeabilitätsschranke beteiligt ist oder sie kann in der Struktur des Antibiotikums selbst begründet liegen, wie beim Nonactin, dem Valinomycin und den Enniatinen gezeigt werden konnte (Pioda u.a., 1967; Pioda u.a., 1968; Wipf u.a.,1968; Shemyakin u.a., 1967). Durch die Isolierung und Röntgenstrukturanalyse des Komplexes von Nonactin mit Kaliumionen (Kilbourn u.a., 1967) konnte verständlich gemacht werden, wie der durch Antibiotika verursachte Transport von Alkaliionen durch die Membran erfolgt. Demnach umschliesst das Nonactin das Kaliumion in einer sandwichartigen Struktur und vermittelt dem Ion dadurch eine Löslichkeit in lipophilen Phasen, da die zur hydrophoben Wechselwirkung befähigten Seitenketten im Komplex

nach aussen gerichtet sind.
Für Nonactin und die anderen erwähnten Antibiotika ergibt sich aus diesen Gründen eine Permeabilitätsbeeinflussung künstlicher Membranen, die durch EMK-Messungen verfolgt werden kann. (Pioda u.a., 1968).

Eine Prüfung des Boromycins nach dieser Methode ergab nun ebenfalls eine Permeabilitätsbeeinflussung künstlicher Membranen aus Tetrachlorkohlenstoff und dem Antibiotikum und eine Selektivität für Kaliumionen, wie aus den biologischen Untersuchungen zu erwarten war. (Tabelle 20). Die gefundenen Selektivitätswerte vom Faktor 2 für Kalium-gegenüber Natrium-Ionen sind zwar kleiner als die für die anderen Antibiotika gefundenen Werte, aber eine Aufhebung der Boromycinwirkung im biologischen Versuch durch Natrium-Ionen ist auf Grund der unterschiedlichen physiologischen Bedeutung der beiden Ionen unwahrscheinlich. Somit stellt die beobachtete Permeabilitätsbeeinflussung eine hinreichende Erklärung für die biologische Wirksamkeit des Boromycins dar.

Tabelle 20 : EMK-Werte der künstlichen Membranen mit Boromycin.

Konzentration an Boromycin 33 mg/ml.
Messgut KCl, NaCl, LiCl 10-1 molar/
LiCl 10^{-3} molar.

Die mV-Werte sind Durchschnittswerte aus mehreren Messungen an den einzelnen Membranen.

Ion	Anspruch in mV			
	Membran I	Membran II	Membran III	CCl_4 (Leerwert)
K^+	28	43	30	41
Na^+	20,5	19,5	19,5	35
Li^+	10	19	21	-
K^+/Na^+	1,4	2,1	1,5	1,1
K^+/Li^+	2,8	2,0	1,4	-

16. Struktur - Wirkungsbeziehungen beim Boromycin.

Das Boromycin enthält, soweit bis heute bekannt, neben der veresterten Borsäure ein ebenfalls durch Esterbindung gebundenes Molekül D-Valin, dessen Aminogruppe zusammen mit der Borsäure ein Zwitterion bildet. Das D-Valin lässt sich durch milde alkalische Hydrolyse abspalten, während die Borsäure aus diesem Abbauprodukt durch saure Hydrolyse entfernt wird. Der Rest des Moleküls stellt nach vorläufigen Ergebnissen eine Polyhydroxyverbindung vom Makrolidtypus dar. Die genaue Struktur des Ringsystems ist noch nicht aufgeklärt. Abbildung 12 zeigt schematisch Formel und Abbau des Boromycins nach Hütter u.a.(1967) :

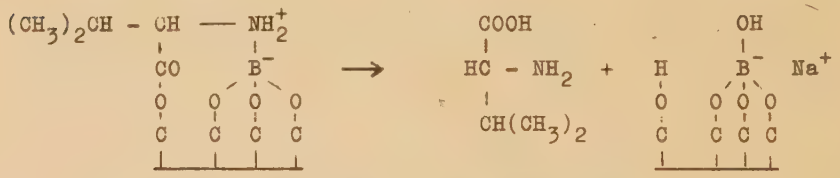

Abb.12 : Struktur und Abbau des Boromycins nach Hütter u.a.(1967).

Das synthetisierte "aktive Zentrum" des Boromycins, der Komplex zwischen D-Valinmethylester und Borsäuretrimethylester, ist ebenso wie alle Borsäureester mit niederen Alkoholen extrem hygroskopisch. Eine antibiotische Wirkung des Komplexes im Plattendiffusionstest ist wegen der Diskrepanz zwischen Hydrolysegeschwindigkeit und der Keimzeit der Sporen von Bacillus subtilis nicht zu erwarten und auch nicht zu beobachten. Eine Prüfung im Biophotometer, wo diese Schwierigkeit wegfällt, ergab aber bei einer Konzentration des Komplexes von 100 µg/ml ebenfalls keine Wirkung.
Die Untersuchung verschiedener, im Handel erhältlicher Borsäureester unter den gleichen Bedingungen zeigte keine Hemmwirkung dieser Substanzen, auch nicht die des Tri-9-octa-

decenylborats, das unter diesen Bedingungen nicht hydrolysiert. Aus diesen Ergebnissen ist zu schliessen, dass das Ringsystem des Boromycins entscheidend an der biologischen Wirkung beteiligt ist. Der Abbau des Boromycins nach der von Hütter u.a. angegebenen Methode ergab, dass die antibiotische Wirkung des Boromycins auch nach Abspaltung des D-Valins noch vorhanden ist. Ein Hemmhofdurchmesser von 18 mm (bei 0,1 mg/ml) entspricht genau der Aktivität des intakten Boromycins. Nach Abspaltung der Borsäure dagegen ist keine Wirkung mehr festzustellen. Damit ist gezeigt, dass für die Hemmwirkung des Boromycins sowohl der makrolidartige Ring als auch die veresterte Borsäure nötig sind. Möglicherweise bindet die Borsäure Kationen, speziell Kalium, durch Salzbildung, während das Ringsystem für die Bindung in der Membran verantwortlich ist. Zur Frage der Essentialität des Bors für die antibiotische Wirkung wäre interessant festzustellen, wie weit Teileffekte (Bindung und Kaliumspezifität) dem Ringsystem allein zuzuschreiben sind. Für die Untersuchung der Kaliumspezifität des Ringsystems stand aber nicht genügend Substanz zur Verfügung. Die Bindung des borfreien Ringsystems wiederum konnte nicht untersucht werden, da keine analytische Methode zum Nachweis des Ringes zur Verfügung steht, denn das Ringsystem enthält weder Bor noch zeigt es antibiotische Aktivität.

IV. D I S K U S S I O N

Um die Wirkung des Boromycins an der Membran zu verstehen, sei hier kurz auf die heutigen Vorstellungen über den Aufbau von Membranen sowie auf deren Funktion eingegangen. Fettsäuren orientieren sich an Grenzflächen zwischen Wasser und Luft in einer monomolekularen Schicht. Diese Anordnung ist am stabilsten bei gesättigten Fettsäuren mittlerer Kettenlänge und lässt sich physikalisch durch eine für ein zweidimensionales Gas modifizierte van-der-Waals Gleichung beschreiben (Brdička, 1958). Doppelbindungen und Verzweigungen stören diese Anordnung beträchtlich, vermutlich da die maximale hydrophobe Wechselwirkung der Kohlenwasserstoffketten nicht mehr gewährleistet ist (Weitzel u.a.,1951). Ähnlich wirkt

sich der Zusatz von Steroiden zu einem solchen Film aus, welche im allgemeinen einen kondensierenden Effekt ausüben (Adam, 1952).

Analog diesen Fettsäurefilmen können sich Phospholipide in bimolekularen Schichten an Grenzflächen orientieren, wobei die Kohlenwasserstoff-Flächen der beiden Schichten einander zugeordnet sind. Eine weitere Anordnungsmöglichkeit besteht in der Bildung von Micellen, die nach Aggregation ebenfalls zur Filmbildung befähigt sind (Lucy und Glauert, 1964).

Ausgehend von Messungen der Oberflächenspannung an solchen Phospholipidfilmen postulierten Danielli und Davson bereits 1935 ein Modell für den Aufbau biologischer Membranen, dessen Struktur der eines bimolekularen Phospholipidfilmes ähnelt (Danielli und Davson, 1943). Nach der Modifizierung dieses Modells durch Robertson (1964) fand es unter dem Begriff der "unit-membrane" weite Verbreitung und wirkte sich sehr fruchtbar auf die Membranforschung aus.

Mit dem auf der unit-membrane-Vorstellung aufgebauten Modell lassen sich viele Eigenschaften biologischer Membranen wie z.B. die selektive Permeabilität für viele Stoffe ausgezeichnet beschreiben. Diese Erfolge des Modells sowie die einheitlichen elektronenoptischen Bilder verschiedenster biologischer Membranen liessen deren Aufbau aus unit-membrane Einheiten als unumstössliche Tatsache erscheinen. Neue Fixierungs- und Färbe-Methoden sowie biochemische Untersuchungen zeigten aber, dass der Aufbau von Membranen komplexer ist, als lange Zeit angenommen wurde. Die relativ einfachen elektronenoptischen Bilder liessen sich nämlich auch nach Extraktion der Lipide aus den Membranen erhalten, ein Hinweis darauf, dass das Protein die strukturbildende Komponente darstellt. (Fleischer u.a.,1967). Auch die Viel-

zahl der Membranfunktionen, die in neuerer Zeit entdeckt wurden, lassen sich mit dem Aufbau von Membranen nach der unit-membrane-Theorie nicht vereinbaren. So konnten die von Green und Mitarbeitern entdeckten "elementary particles" der inneren Mitochondrienmembran von denselben Autoren abgetrennt und biochemisch analysiert werden (Green und Fleischer, 1963; Kopaczyk u.a.,1968). Diese Untereinheiten, die man sich als globuläre Proteine vorstellt, sind bei Untersuchungen verschiedenster Membranen beschrieben worden, unter anderem als Bestandteil der Membran von Mikroorganismen (Bladen u.a.,1964). Die charakteristischen Bestandteile jeder Membran sind Lipide und Protein. Die Zusammensetzung der Lipidfraktion variiert stark von Membran zu Membran. Im allgemeinen überwiegt der Anteil der Phospholipide über den der Neutralfette, bei der Mitochondrienmembran z.B. liegt das Verhältnis bei etwa 9:1 (Green u. Fleischer, 1963). In der Lipidfraktion bakterieller Membranen fehlt das Phosphatidylcholin sowie weitgehend die Steroide (Schubert u.a.,1968), dagegen findet man die bei höheren Organismen bisher nicht bekannten "lipoaminoacids", Aminosäureester von Phosphatidylglycerol (Macfarlane, 1962). Von Bishop u.a.(1967) liegt eine detaillierte Analyse der Membranlipide von Bacillus subtilis vor, des bei den Untersuchungen zur Wirkungsweise des Boromycins eingesetzten Testorganismus. Danach beträgt der Anteil der Lipide an der Membran 18% mit einer Zusammensetzung von 11% Neutralfetten, 12% Glykolipiden und 77% Phospholipiden. Eigene Untersuchungen ergaben ähnliche Ergebnisse.

Die Wechselwirkung zwischen Lipiden und Proteinen stellt man sich nach dem Konzept der unit-membrane-Theorie derart vor, dass die ionischen Gruppen des Phospholipidfilmes mit den überschüssigen Carboxyl- und Aminogruppen der Aminosäuren des den Film überlagernden Proteins eine elektrostatische Bindung eingehen. Das würde aber voraussetzen, dass

der Anteil der mehrfunktionellen Aminosäuren in diesem Protein übermässig hoch wäre, was nicht zu beobachten ist (Lenard und Singer,1966). Untersuchungen an Erythrocytenmembranen mittels IR- und NMR-Spektroskopie machten ausserdem wahrscheinlich, dass die Bindung von Lipid und Protein vorwiegend auf einer hydrophoben Wechselwirkung beruht (Chapman u.a.,1967; Chapman u.a.,1968a; Chapman u.a.,1968b). Ferner konnten Lenard und Singer (1966) durch ORD- und CD.-Studien an Erythrocyten membranen und Membranen von Bacillus subtilis zeigen, dass diese hydrophobe Wechselwirkung entscheidend zur Stabilisierung der Proteinstruktur beiträgt.

Lenard und Singer postulierten daraufhin ein Membranmodell, dass die erwähnten experimentellen Ergebnisse berücksichtigt. Nach diesem Modell ist die Membran aus Untereinheiten aufgebaut, die aus globulären Proteinen gebildet werden. Die Aussenschicht dieser Partikel wird von teilweise in a-Helixstruktur vorliegenden Peptidketten sowie den polaren Gruppen der Phospholipide gebildet, während die unpolaren Seitenketten der Peptide zusammen mit den Kohlenwasserstoffresten der Phospholipide und eventuell vorhandenen Neutralfetten im Innern in Wechselwirkung treten (Abb.13). Um das Modell zu prüfen, liessen die Autoren Phospholipase C (EC 3.1.4.3.) auf Erythrocytenmembranen einwirken und beobachteten eine Freisetzung von 70% des in der Membran enthaltenen Phosphats (Lenard und Singer, 1968). Wären die Phospholipide wie vom Danielli-Davon-Modell gefordert von einer Proteinschicht bedeckt, so sollte keine Freisetzung von Phosphat durch Phospholipase erfolgen. Betrachtet man die Zusammensetzung des aus Eigelb isolierten Lipoproteins, so fällt das ungewöhnlich hohe Verhältnis von Lipid zu Protein auf. Um die Löslichkeit in wässrigem System zu gewährleisten, muss dieses Lipid von einer Proteinschicht eingehüllt sein. Der analog dem Experiment von Lenard und Singer angestellte Versuch mit Phospholipase zeigt, dass die

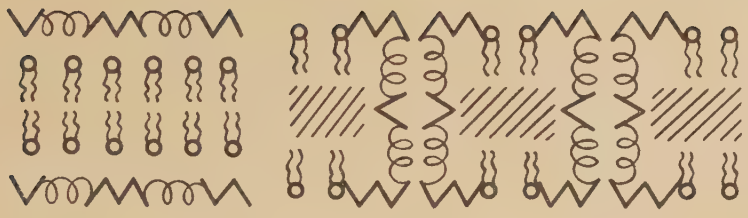

Abb. 13 : Membranmodell nach Lenard und Singer (rechts), zum Vergleich das unit-membrane-Modell nach Robertson (links); nach Lenard u. Singer (1966).

Zeichenerklärung:

: Phospholipidmolekül
: Peptidkette mit "random-coil" Anordnung
: Peptidkette mit Helixstruktur
: Neutralfette.

Aussenschicht der Lipoproteinteilchen nicht nur von Protein, sondern auch von polaren Gruppen der Phospholipide gebildet wird.

Es ist daher wahrscheinlich, dass die Lipoproteinteilchen in ihrer Struktur Ähnlichkeit mit den Untereinheiten der Membran besitzen, wie sie von Lenard und Singer vorgeschlagen wurden. Diese Vorstellung, die durch die Bindung von Boromycin und Phytol an das Lipoprotein untermauert wird, legt es nahe, dieses Lipoprotein als leicht zugängliches Modell der Membranuntereinheiten zu betrachten und in weiteren Experimenten zu untersuchen.

Betrachtet man die Funktionen, die bei Bakterien der Cytoplasmamembran und dem internen Membransystem zugeschrieben werden, so fällt die grosse Mannigfaltigkeit dieser Prozesse ins Auge. (Tabelle 21).

Tabelle 21 : Funktionen der Membran bei Mikroorganismen.

Funktion:	Literaturzitat:
Genverdoppelung und Zellteilung	Ryter und Jacob, 1966
DNS-Synthese	Ganesan und Lederberg, 1965
Ribosomale RNS-Synthese	Nielsen und Abrams, 1964 Burd, 1967.
Proteinsynthese	Schlesinger, 1963 Bubela und Holdsworth, 1966
Atmung und oxidative Phosphorylierung	Downey, 1964 Broberg und Smith, 1967.
Sporenbildung	Ohye und Murrell, 1962 Ryter, 1965
Zellwandsynthese	Ryter und Landman, 1964. Anderson u.a., 1967.
Synthese von Membranbestandteilen	Klein u.a., 1967 Macfarlane, 1964.
Synthese von Polysacchariden	Markovitz und Dorfman, 1962.
Synthese von Poly-β-Hydroxybutyrat	Merrick und Doudoroff, 1961.
ATP-ase Aktivität	Weibull u.a.,1962, Gross und Coles, 1968.
Aktiver Transport	Marquis und Gerhardt, 1964.
Permeabilitätsschranke	Grundfest, 1967.

Diese Aufstellung lässt sich noch erweitern, wenn man die photosynthetisierenden und chemoautotrophen Organismen mit einbezieht. Zweifellos ist die Vorstellung richtig, die der Membran bei Mikroorganismen eine dem endoplasmatischen Retikulum höher organisierter Zellen analoge Funktion zuschreibt. Diese Kompartmentierung macht es verständlich, dass eine solch grosse Vielfalt von Prozessen unterschiedlichster Funktion mit der Membran verknüpft sind, und dass diese Funktionen eine solch komplexe Organisation besitzen.

Ein an der Membran angreifendes Antibiotikum kann im Prinzip alle diese Funktionen blockieren, wenn es durch seine Bindung

in der Membran deren Struktur verändert. Die Unterscheidung zwischen der für die Hemmung der Zelle verantwortlichen, durch das Antibiotikum spezifisch geblockten Stoffwechselfunktion und dadurch mit betroffenen Folgereaktionen ist daher schwierig, wenn nicht gar mit den heute zur Verfügung stehenden Methoden unmöglich. Trotzdem ist an Hand der angestellten Versuche möglich, für das Boromycin eine primäre Blockierung mehrerer Stoffwechselfunktionen auszuschliessen.

Die Entfaltung der antibiotischen Wirkung in allen Wachstumsphasen (Abb.1) schliesst sowohl einen primären Einfluss auf die Zellteilung als auch auf die Sporenbildung aus. Gleichzeitig macht die Hemmung in der stationären Wachstumsphase einen Einfluss auf die Zellwandsynthese unwahrscheinlich, da z.B. Penicillin, ein spezifischer Hemmstoff für diesen Prozess, seine Wirkung nur bei sich vermehrenden Zellen entfaltet (Hobby u.a.,1942). Eine Blockierung der oxidativen Phosphorylierung wiederum kann durch die Wachstumshemmung von Clostridium pasteurianum ausgeschlossen werden, da dieser obligate Anaerobier seinen Energiebedarf nicht durch oxidative Phosphorylierung deckt (Stadtman, 1966).

Die Blockierung der Syntheseleistungen wiederum, wie sie z.T. bei in vivo Versuchen verfolgt wurde, lässt sich durch einen Abfall der intrazellulären Kaliumionenkonzentration erklären. Lubin und Ennis (1964) konnten durch Versuche am zellfreien System der Proteinsynthese aus Escherichia coli zeigen, dass Kaliumionen einen essentiellen Cofaktor für diesen Prozess darstellen. Nach neueren Versuchen derselben Autoren ist es die Polyribosombildung, die bei Fehlen von Kaliumionen blockiert ist (Ennis, 1968). Ferner ist die Aktivierung von Aminoacyl-sRNS-Synthetasen durch Kaliumionen nachgewiesen worden (Tao Yu und Hirsh,1967). So u.a.(1967) wiederum beobachteten die Aktivierung der DNS-abhängigen RNS-Polymerase aus Escherichia coli durch Kaliumionen, und darüberhinaus

diskutiert man die Rolle des Kaliums bei der Aktivierung verschiedener Enzyme (Rink u.a.,1968; Welch u.a.,1968), beim aktiven Transport von Aminosäuren (Harris und Friedman,1967) und nicht zuletzt bei der oxidativen Phosphorylierung. Bei diesem Prozess ist bei reichlichem Angebot an anorganischem Phosphat die Kaliumionen-Konzentration der begrenzende Faktor (Pressman und Lardy, 1955). Ein solcher Einfluss auf die oxidative Phosphorylierung, wie er bei Mitochondrien beobachtet wurde, würde bei Bacillus subtilis zusammen mit dem durch Boromycin verursachten zyklischen Ionenfluss zu einem sich quasi autokatalytisch steigernden Zusammenbrechen der ATP-Versorgung führen.

Diese Ausführungen machen es wahrscheinlich, dass die Veränderung der Permeabilität für Kaliumionen tatsächlich den für die Hemmung verantwortlichen Angriff des Boromycins in der Zelle darstellt. Für die Aufrechterhaltung der Kaliumionenkonzentration in der Zelle ist neben der Permeabilitätsschranke der Transport der Ionen in die Zelle verantwortlich. Der Transport von Kaliumionen ist ein aktiver Transport, das heisst er verbraucht laufend Energie für die Arbeit gegen den Konzentrationsgradienten. Eng verknüpft mit dem Transport von Ionen ist die Aufrechterhaltung des Membranpotentials, das Ausdruck für die während des Transports geleistete elektrochemische Arbeit ist. Der aktive Transport für Kalium kann durch das Herzglykosid Ouabain blockiert werden (Richardson,1968) und in gleicher Weise ist auch die aus Erythrocytenmembranen isolierte K^+-Na^+- aktivierbare ATP-ase gegen Ouabain empfindlich (Post u.a.,1960). Diese Analogie sowie gleiche kinetische Verhältnisse machen es wahrscheinlich, dass die ATP-ase selbst die Pumpstruktur für den Kalium- und Natrium-Ionentransport darstellt (Skou,1967). Glynn konnte mit der Methode der reversiblen Haemolyse an Erythrozyten sogar zeigen, dass die ATP-ase durch extrazelluläre Kaliumionen

und intrazelluläre Natriumionen aktiviert wird, nicht aber bei umgekehrter Verteilung der Ionen.(Glynn,1962). Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit der Ionenverteilung in der Blutbahn, wo die Erythrocyten gegenüber der sie umgebenden Flüssigkeit einen Überschuss an Kalium aufweisen. Die K^+-Na^+-aktivierbare ATP-ase ist in tierischen Geweben weit verbreitet (Bonting u.a.,1961) und in neuerer Zeit häufen sich die Berichte über das Vorkommen des Enzyms bei Mikroorganismen, ein Hinweis dafür, dass der Kaliumtransport hier auf ähnliche Weise abläuft (Abrams und Baron, 1967; Gross und Coles,1968; Hafkenscheid und Bonting,1968). Ob die ATP-ase für ihre Wirkung einen Carrier benötigt, ist nicht geklärt. Die Induktion des Kaliumtransports bei Mitochondrien durch Valinomycin macht es aber wahrscheinlich (Pressman u.a. 1967). Zwar ist die Wirkung des Valinomycins nicht am isolierten Enzym untersucht, aber offensichtlich entfaltet es seine Wirkung speziell an der Ionenpumpe im Gegensatz zu Nigericin, das eine generelle Erhöhung der Permeabilität der Mitochondrienmembran für Kationen bewirkt. Diese Ionentransportierenden Antibiotika, von Pressman "Ionophores" genannt, erfüllen jedenfalls alle Forderungen, die an die bisher hypothetischen Carriersubstanzen gestellt werden. Der Carrier muss z.B. mit dem zu transportierenden Substrat einen Komplex bilden (Stein,1967). Diese Forderung wird durch die Isolierung des Komplexes von Nonactin mit Kaliumionen hinreichend erfüllt (Pioda u.a.,1967). Und durch die Röntgenstrukturanalyse dieses Komplexes wird gezeigt, wie die Komplexbildung dem Alkaliion einen Transport durch eine Lipidbarriere ermöglicht (Kilbourn u.a.,1967). Die Umhüllung des zur Komplexbildung nötigen polaren Zentrums mit zur hydrophoben Wechselwirkung befähigten Seitenketten muss für den Transport über eine solche Barriere günstig sein, denn diese Anordnung ist die genaue Umkehrung des Aufbaus der für die Zusammensetzung der Membran postulierten Untereinheiten, bei denen eine Lipid-

phase von polaren Gruppen der Peptide und Phospholipide umhüllt wird. (Lenard u.Singer, 1966).

Es ist zu erwarten, dass durch das Studium dieser ionentransportierenden Antibiotika weitere Anhaltspunkte dafür gewonnen werden, wie das Zusammenspiel hydrophiler und hydrophober Zentren verstanden werden kann, und dass etwas über Natur und Funktion der natürlichen Carriersubstanzen zu erfahren ist. Eine weitere Hilfe dürften Modellsubstanzen sein, die zeigen, welche Voraussetzungen eine Substanz für die Funktion als Carrier erfüllen muss. Eine kürzlich beschriebene modifizierte Nitriloessigsäure, die zur Vermittlung der Lipoidlöslichkeit mit einem langen Kohlenwasserstoffrest verknüpft ist und einen Carrier für dreiwertige Kationen darstellt, ist ein solches Beispiel (Vlcek, 1967).

Durch die Untersuchung der Wirkungsweise des Boromycins bei Bacillus subtilis in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieses Antibiotikum ein weiteres Beispiel für solch einen Carrier darstellt. Wenn auch die Frage nach dem Mechanismus der Kaliumbindung des Boromycins auf Grund der noch nicht restlos aufgeklärten Struktur des Antibiotikums nicht zu beantworten ist, lassen sich doch durch die Synthese- und Abbau-Versuche einige Vermutungen anstellen.

Das Boromycin ist ein nach aussen neutrales Zwitterion (Hütter u.a.,1967), aber der mit Alkaliionen gebildete Komplex ist anscheinend geladen, da sich sonst keine Potentialänderungen an künstlichen Membranen feststellen liessen, (Pressman u.a.,1967). Möglicherweise wird die positiv geladene Aminogruppe des Boromycins durch die Sauerstoffunktionen des Rings soweit abgeschirmt, dass das Alkaliion mit der negativ geladenen Borsäuregruppe eine Salzbildung eingehen kann. Für diese Annahme spricht auch die Erhaltung der antibiotischen Aktivität nach Abspaltung des D-Valins aus dem

Boromycin, da die Bindung des Alkaliions durch die Borsäure immer noch erfolgen kann. Durch Abspaltung der Borsäure schliesslich geht auch die antibiotische Aktivität verloren.

Die Selektivität für Kaliumionen dagegen wird durch eine elektrostatische Bindung nicht erklärt. Diese dürfte vielmehr durch die Konformation des Ringsystems bedingt sein, wie es ja auch bei den Makrotetroliden (Nonactin etc.) der Fall ist. Für das Zustandekommen der Wirkung des Boromycins sind somit sowohl die Zwitteriongruppierung als auch das Ringsystem massgebend, welches dem Molekül durch seine Löslichkeitseigenschaften eine Bindung in der Cytoplasmamembran vermittelt.

V. ZUSAMMENFASSUNG.

Die minimale Hemmkonzentration des Boromycins bei Bacillus subtilis in definiertem Medium liegt bei 0,05 µg/ml. Die Wirkung des Antibiotikums wird durch zahlreiche Lipide antagonisiert. Ein spezifischer Antagonist konnte aus Eigelb isoliert und charakterisiert werden. Es handelt sich um ein Lipoprotein mit einem Lipidanteil von 85% des Trockengewichtes. Die Identität des Proteins mit β-Lipovitellin konnte wahrscheinlich gemacht werden.

Die antagonisierende Wirkung der Lipide beruht auf einer Verdrängung des Boromycins von der Zelle, während das Lipoprotein das Antibiotikum ausserhalb der Zelle bindet. Auch andere Antibiotika, die ihre Wirkung an der Cytoplasmamembran entfalten, werden von dem Lipoprotein gebunden. Zellen und Membranfragmente von Bacillus subtilis binden Boromycin in vergleichbaren Konzentrationen. Bei Zusatz von Boromycin zu Zellen und Verfolgung der Verteilung des Antibiotikums durch Borbestimmung in den einzelnen Fraktionen finden sich 80% des Boromycins im Membransystem. Die Synthese von Protein, RNS und DNS in der Zelle stagniert bei Zusatz von Boromycin. Dagegen fällt der Sauerstoffverbrauch der Kultur erst nach einiger Zeit ab. Dieses Bild der Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung wird durch eine Beeinflussung des Ionentransports hervorgerufen. Hohe Konzentrationen an Kaliumionen antagonisieren die Wirkung des Boromycins. Bei Boromycinzusatz erfolgt ein Ausfluss von intrazellulärem Kalium aus den Zellen. Das Boromycin ist selbst für den Transport der Ionen über die Membran verantwortlich. Bei EMK-Messungen an künstlichen Membranen wird eine geringe Selektivität des Boromycins für Kaliumionen beobachtet.

Durch Abbau des Boromycins lässt sich zeigen, dass die antibiotische Wirkung nach Abspaltung des D-Valins erhalten bleibt. Sie verschwindet aber nach Abspaltung der Borsäure aus dem Molekül.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Abrams, A. und C.Baron: The isolation and subunit structure of Streptococcal membrane adenosine triphosphatase. Biochemistry 6, 225-229 (1967).

Adam, N.K.: "The physics and chemistry of surfaces", 3rd ed. Pergamon Press, Oxford und London 1952.

Anderson, J.S., M. Matsuhashi, M.A.Haskin und J.L.Strominger: Biosynthesis of peptidoglycan of bacterial cell walls. II. Phospholipid carriers in the reaction sequence. J.Biol.Chem. 242, 3180-3190 (1967)

Andrews, P.: Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration. Biochem.J. 91, 222-233 (1964)

Bamzai, R.D. und G.S. Randhova: Effect of certain growth substances and boric acid on germination, pollen tube growth and storage of grape pollen (vitis species). Vitis 6, 269-277 (1967).

Bartlett, G.R.:Phosphorus Assay in Column Chromatography. J.Biol.Chem. 234, 466-468 (1959).

Benedict,R.G. und A.F.Langlykke: Antibiotic activity of Bacillus polymyxa. J.Bact. 54, 24-25 (1947)

Berger, J., L.M. Jampolski und M.W.Goldberg: Borrelidin, a new antibiotic with high antiborrelia activity and Penicillin enhancement properties. Arch. Biochem. 22, 476-478 (1949).

Bernardi, G. und W.H.Cook: An electrophoretic and ultracentrifugal study on the proteins of the high density fraction of egg yolk. Biochim.Biophys. Acta 44, 86-96 (1960).

Bersin, T.: "Biochemie der Mineral- und Spurenelemente", Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt a. Main 1963 Seite 518-522.

Bishop, D.G., L. Rutberg und B. Samuelson: The chemical composition of the cytoplasmic membrane of Bacillus subtilis. Europ. J. Biochem. 2, 448-453 (1967).

Bladen, H., M. Nylen und R. Fitzgerald: Internal structures of a Eubacterium sp. demonstrated by the negative staining technique. J. Bact. 88, 763-770 (1964).

Bligh, E.G. und W.J. Dyer: A rapid method of total lipid extraction and purification. Can.J.Biochem. Physiol. 37, 911-917 (1959).

Bock, E.: pH-metrische Bestimmung der oxidativen Phosphorylierung bei Ganzzellen von Nitrobacter winogradskyi Buch.Arch.Mikrobiol. 58, 169-180 (1967).

Bonifas, V.: Determination de l'association synergique binaire d'antibiotes et de sulfamides. Experientia 8, 234-235 (1952).

Bonting, S.L., K.A.Simon und N.M.Hawkins: Studies on sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase. I. Quantitative distribution in several tissues of the cat. Arch.Biochem. 95, 416-423 (1961).

Boyd,G.S.: The estimation of serum lipoproteins. A micromethod based on zone electrophoresis and cholesterol estimations. Biochem.J. 58, 680-685 (1954).

Brdicka, R.: "Grundlagen der physikalischen Chemie". VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1958 Seite 488.

Broberg,P.L. und L. Smith: The cytochrome system of Bacillus

megaterium KM. The presence and some properties of two CO-binding cytochromes. Biochim.Biophys. Acta 131, 479-489 (1967).

Brockmann, H. und H. Gröne: Reine Actinomycine. Naturwissenschaften 41, 65 (1954).

Brockmann, H. und G.Schmidt-Kastner: Valinomycin.XXVII. Mitteilung über Antibiotika aus Actinomyceten. Chem.Ber. 88, 57-61 (1955).

Bubela, B. und F.S. Holdsworth: Protein synthesis in Bacillus stearothermophilus. Biochim.Biophys.Acta 123, 376-389 (1966).

Burd, G.I.: Participation of bacterial membranes in DNA and RNA biosynthesis. Zh.Mikrobiol.Epidemiol. Immunbiol. 44, 124-128 (1967).

Carnahan, J.E. und J.E.Castle: Some requirements of biological nitrogen fixation. J. Bact. 75,121-124 (1958).

Chapman, D., V.B.Kamat, J. De Gier und S.A.Penkett: NMR spectroscopic studies of erythrocyte membranes. Nature 213, 74-75 (1967).

Chapman,D., V.B.Kamat, J. de Gier und S.A.Penkett: Nuclear magnetic resonance studies of erythrocyte membranes. J.Mol.Biol. 31, 101-114 (1968a).

Chapman, D., V.B.Kamat und R.J. Levene: Infra-red spectra and the chain organization of erythrocyte membranes. Science 160, 314-316 (1968 b).

Chino, H., A. Sudo und K. Harashima: Isolation of diglyceride-bound lipoprotein from insect hemolymph. Biochim.Biophys. Acta 144, 177-179 (1967).

Cook, W.H.: Proteins of hen's egg yolk. Nature 190 1173-1175 (1961).

Cooper, K.E.: "The theory of antibiotic inhibition zones", in "Analytical Microbiology", F. Kavanagh ed., Academic Press New York u.London, 1963 Seite 1 - 86.

Corbaz, R., L. Ettlinger, E. Gäumann, W.Keller-Schierlein, F. Kradolfer, L. Neipp, V.Prelog und H.Zähner: Stoffwechselprodukte von Actinomyceten. 3. Mitteilung. Nonactin.Helv.Chim.Acta 38, 1445-1448 (1955).

Corbaz, R., L. Ettlinger, W.Keller-Schierlein und H. Zähner: Zur Systematik der Actinomyceten. 1. Über Streptomyceten mit rhodomycinartigen Pigmenten. Arch.Mikrobiol. 25, 325-332 (1957).

Crueger, W.: Untersuchungen zur Sideramin-Biogenese. Dissertation Universität Tübingen, 1968.

Danielli, J.F. und H.A. Davson: "The permeability of natural membranes" Cambridge University Press, New York 1943.

Dische, Z.: Über einige neue charakteristische Farbreaktionen der Thymonukleinsäure und eine Mikromethode zur Bestimmung derselben in tierischen Organen mit Hilfe dieser Reaktionen. Mikrochemie 8, 4-32 (1930).

Downey, R.: Vitamin K mediated electron transfer in Bacillus subtilis. J. Bact.88, 904-911 (1964).

Dubos, R.J.: Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus. I. Preparation of the agent. Its activity in vitro. J.Exp.Med.70, 1-10 (1939).

Engelman, D.M., T.M. Terry und H.J. Morowitz: Characterization of the plasma membrane of Mycoplasma laidlawii. I.Sodium dodecylsulfat solubilization.

Biochim.Biophys. Acta 135, 381 - 390 (1967).

Ennis, H.L.: Role of K^+ in the regulation of polysome content of Escherichia coli cells. Bact. Proc.1968 113 (P12).

Fairbairn, D.: The phospholipase of the venom of the cotton-mouth moccassin (Agkistrodon Piscivorus L.). J. Biol.Chem. 157, 633-644 (1945).

Few, A.V. und J.H. Schulman: The absorption of Polymyxin E by bacteria and bacterial cell walls and its bactericidal action. J.Gen. Microbiol. 9, 454-466 (1953).

Finlay, A.C., G.L.Hobby, S.Y. P'Au, P.P. Regna, J.B.Routien, D.B.Seeley, G.M.Shull, B.A.Sobin, I.A.Solomons, J.W.Winson and J.H. Kane: Terramycin, a new antibiotic. Science 111, 85 (1950).

Fleischer, S., B. Fleischer und W. Stoeckenius: Fine structure of lipid depleted mitochondria. J.Cell.Biol. 32, 193-208 (1967).

Fleming, A.: "Penicillin, its practical application". The Blakiston Co., Philadelphia 1946.

Gäumann, E., R. Hütter, W. Keller-Schierlein, L.Neipp, V. Prelog und H. Zähner: Lankamycin and Lankacidin. Helv.Chim.Acta 43, 601-606 (1960).

Gäumann, E., S.Roth, L. Ettlinger, P.A. Plattner und V.Nager: Enniatin, ein neues gegen Mykobakterien wirksames Antibiotikum. Experientia 3, 202-203 (1947).

Ganesan,A. und J. Lederberg: A cell-membrane bound fraction of bacterial DNA. Biochem. Biophys.Res.Commun. 18, 824-835 (1965).

Gauze, G.F. und M.G.Brazhnikova: Gramicidin S.Zh.Mikrobiol. Epidemiol.Inst. 4-5, 74 (1943).

Gerloff, G.C.: The comparative boron nutrition of several green and blue-green algae. Physiol.Plant. 21, 369-377 (68).

Glynn, J.: Activation of adenosintriphosphatase activity in a cell membrane by external potassium and internal sodium. J. Physiol. 160, 18P-19P(1962).

Godtfredsen, W.O., S. Jahnsen, H.Lorck, K. Roholt und L. Tybring: Fusidic acid: a new antibiotic. Nature 193, 987 (1962).

Golterman, H.L. und I.M. Wurtz: A sensitive, rapid determination of inorganic phosphate in presence of labile phosphate esters. Analyt.Chim.Acta 25, 295-297 (1961).

Gottlieb, D.: Antibiotics and cell metabolism. Hindustan Antibiotics 10, 123-134 (1967).

Gottlieb, D., P.K. Bhattahcaryya, H.W.Anderson und H.E. Corter: Some properties of an antibiotic obtained from a species of streptomyces. J. Bact. 55, 409-417 (1948).

Gottlieb, D. und P.D. Shaw: "Antibiotics. Volume I. Mechanism of action". Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1967.

Green, D.E. und S. Fleischer: The role of lipids in mitochondrial electron transfer and oxidative phosphorylation. Biochim. Biophys. Acta 70, 554-582 (1963).

Greenstein, J.P. und M. Winitz: "Chemistry of the amino acids" John Wiley, New York und London 1961.

Gross, R. und N.W.Coles: Adenosine triphosphatase in isolated membranes of staphylococcus aureus. J.Bact. 95, 1322-1326 (1968).

Grundfest,H.: Some comparative biological aspects of membrane permeability control. Federation Proc. 26, 1613-1626 (1967)

Hafkenscheid, J.C.M. und S.L. Bonting: Studies on (Na^+-K^+)-activated ATPase. XIX. Occurrence and properties of Na^+-K^+-activated ATPase in Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta 151, 204-211 (1968).

Harned, R.L., P.H. Hidy und E.K.LaBaw: Cycloserine. I. A preliminary report. Antibiot. and Chemother. 5, 204-205 (1955).

Harold, F.M. and J.F. Baarda: Gramicidin, Valinomycin and cation permeability of Streptococcus fecalis. J.Bact. 94, 53-60 (1967).

Harold, F.M. und J.F. Baarda: Effect of Nigericin and Nonactin on cation permeability of Streptococcus fecalis and metabolic capacities of potassium-depleted cells. J.Bact. 95, 816-833 (1968).

Harris, E.J., R.Cockrell und B.C.Pressman: Induced and spontaneous movements of potassium into mitochondria. Biochem.J. 97, 38 P (1965).

Harris, E.J. und L. Friedman: The study of membrane function by observation of the change in rate of transcellular migration of amino acids. Biochemistry 6, 2814-2819 (1967).

Hawke, J.C. und C.H. Lea: Lipovitellin. Chemical composition of the lipid and of the fractions removed by various treatments. Biochem.J.54, 479-483(1953).

Heer, E. und R.Bachofen: Pyruvatstoffwechsel von Clostridium butyricum. Arch.Mikrobiol. 54, 1-13 (1966).

Hobby, G.L., K.Meyer und E.Chafee: Obeervations on the

mechanism of action of Penicillin. Proc. Soc.Exptl.Biol.Med. 50, 281-285 (1942).

Hütter, R., W.Keller-Schierlein, F.Knüsel, V.Prelog, G.C. Rodgers jr., P.Suter, G.Vogel, W.Voser und H.Zähner: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 57.Mitteilung: Boromycin. Helv.Chim.Acta 50, 1533-1539 (1967).

Hütter, R., K.Poralla, H.G.Zachau und H.Zähner : Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 51. Mitteilung: Über die Wirkungsweise von Borrelidin - Hemmung des Threonineinbaus in sRNA. Biochem.Z. 344, 190-196 (1966).

Juillard, M.: Über Cobalamine einer Mutante von Bacillus megaterium De Bary. Zbl.Bakt.Parasit.Infekt. Abt.II, 110, 701-727 (1957).

Kavanau, J.L.: "Structure and function in biological membranes". Holden-Day, Inc., San Francisco-London-Amsterdam 1965. Vol. I, Seite 164.

Kilbourn, B.T., J.D.Dunitz, L.A.R.Pioda und W.Simon: Structure of the K^+- complex with Nonactin, a Macrotetrolide antibiotic possessing highly specific K^+- transport properties. J.Mol.Biol. 30, 559-563 (1967).

Klein, H.P., C.M. Volkmann und M.A.Leaffer: Subcellular sites of lipid synthesis in Saccharomyces cerevisiae. J.Bact. 94, 61-65 (1967).

Koch, O.G. und G.A. Koch-Dedic: "Handbuch der Spurenanalyse". Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York 1964. Seite 353-387.

Kopaczyk, K., J.Asai, D.W.Allmann, T.Oda und D.E.Green : Resolution of the repeating unit of the inner mitochondrial membrane. Arch.Biochem.Biophys. 123, 602-621 (1968).

Lee, S. und S. Aronoff: Boron in plants: a biochemical role. Science 158, 798-799 (1967).

Lenard, J. und S.J.Singer: Protein conformation in cell membrane preparations as studied by optical rotatory dispersion and circular dichroism. Proc. Nat. Acad. Sci. 56, 1828-1835 (1966).

Lenard, J. und S.J. Singer: Structure of membranes: reaction of red blood cell membranes with Phospholipase. C. Science 159, 738-739 (1968).

Lipmann, F. und L.C. Tuttle: A specific micromethod for the determination of acyl phosphates. J. Biol. Chem. 159, 21-28 (1945).

Lovenberg, W., B.B.Buchanan und J.C. Rabinowitz: Studies on the chemical nature of Clostridial Ferredoxin. J.Biol.Chem. 238, 3899-3913 (1963).

Lowry, O.H., N.J.Rosebrough, A.L.Farr und R.J.Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193, 265-275 (1951).

Lubin, M.: Intracellular potassium and control of protein synthesis. Federation Proc.23, 994-1001 (1964).

Lubin, M. und H.L.Ennis: On the role of intracellular potassium in protein synthesis. Biochim. Biophys. Acta 80, 614-631 (1964).

Lucy, J. und A.Glauert: Structure and assembly of macromolecular lipid complexes composed of globular micelles. J.Mol.Biol. 8, 727-748 (1964).

Luijk, A.van: Antagonism between various micro-organisms and different species of the genus Phytium, parasitizing upon grasses and lucerne. Med-ed.Phytopathol.Lab.Scholten 14, 43 - (1938).

Macfarlane,M: Characterization of lipoaminoacids as o-aminoacid esters of phosphatidylglycerol. Nature 196, 136-138 (1962)

Maeda, K., H.Kosaka, K. Yagashita und H. Umezawa: A new antibiotic, phleomycin. J. Antibiot. 9, 82-85 (1956).

Mao, J.C.H. und R.G. Wiegand: Mode of action of macrolides. Biochim. Biophys. Acta 157, 1404-1413 (1968).

Markovitz, A. und A.Dorfman: Synthesis of capsular polysaccharide (hyaluronic acid) by protoplast membrane preparations of group A Streptococcus. J.Biol.Chem. 237, 273-279 (1962).

Marquis, R. und P. Gerhardt: Respiration-coupled and passive uptake of a-aminoisobutyric acid, a metabolically inert transport analogue by Bacillus megaterium. J. Biol.Chem. 239, 3361-3371 (1964).

McCormick, M.H., W.M. Stark, G.E. Pittenger und J.M. McGuire: Vancomycin, a new antibiotic. I.Chemical and biological properties. Antibiotics Annual 1955-1956, 606 - 611.

McGuire, J.M., R.L. Bunch, R.C. Anderson, H.E. Boaz, E.H. Flynn und H. Powell: Erythromycin, a new broad spectrum antibiotic. Antibiot. and Chemother. 2, 279-280 (1952).

Mejbaum, W.: Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen, insbesondere in den Derivaten der Adenylsäure. Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 258, 117-120 (1939).

Merrick, I. und M. Doudoroff: Enzymic synthesis of Poly-β-hydroxybutyric acid in bacteria. Nature 189, 890-892 (1961).

Müller, A.: Siderochrome aus Mikroorganismen. Dissertation Universität Tübingen, 1968.

Newton, B.A.: The absorption of polymyxin by cell-wall preparations from Pseudomonas aeruginosa. J. Gen. Microbiol. 10, iii-iv (1954).

Newton, B.A.: The properties and mode of action of the polymyxins. Bact. Rev. 20, 14-27 (1956)

Nielsen, L. und A. Abrams: Rapidly labelled ribosomal RNA associated with membrane ghosts of Streptococcus fecalis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 17, 680-684 (1964)

Ohye, D. und W. Murrell: Formation and structure of the spore of Bacillus coagulans. J. Cell. Biol. 14, 111-123 (1962).

Park, J.T. und M.J. Johnson: Accumulation of labile phosphate in Staphylococcus aureus grown in the presence of Penicillin. J.Biol.Chem. 179, 585-592 (1949).

Pioda, L.A.R., H.A. Wachter, R.E. Dohner und W. Simon: Komplexe von Nonactin und Monactin mit Natrium-, Kalium- und Ammoniumionen. Helv. Chim. Acta 50, 1373-1376 (1967).

Pioda, L.A.R., H.K. Wipf und W. Simon: Kristalliner Komplex von Kaliumrhodanid mit Valinomycin, einem Antibiotikum hoher Kaliumionenslektivität. EMK-Messungen an künstlichen Membranen. Chimia 22, 189-191 (1968).

Poralla, K.: Zur Wirkungsweise des makrolidartigen Antibiotikums Borrelidin und typischer Makrolid-Antibiotika. Dissertation Universität Tübingen, 1967.

Porter, J.N., R.L. Hervitt, C.W. Hesseltine, G. Krutka, J.A. Lowery, W.S. Wallace, N. Bohonos und J.H. Williams: Achromycin, a new antibiotic having trypanocidal properties. Antibiot. and Chemother. 2, 409-410 (1952).

Post, R.L., C.R. Merritt, C.R. Kinsolving und C.D. Albright: Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte. J. Biol. Chem. 235, 1796-1802 (1960).

Pressman, B.C.: Induced active transport of ions in mitochondria. Proc.Nat.Acad.Sci. 53, 1076-1083 (1965).

Pressman, B.C., E.J. Harris, W.S. Jagger und J.H. Johnson: Antibiotic mediated transport of alkali ions across lipid barriers. Proc.Nat.Acad.Sci. 58, 1949-1956 (1967).

Pressman, B.C. und H.A. Lardy: Further studies on the potassium requirements of mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 18, 482-487 (1955).

Radomski, M.W. und W.H. Cook: Chromatographic separation of phosphovitin, a- and β-Lipovitellin of egg yolk granules on TEAE-cellulose. Canad.J. Biochem. 42, 1203-1215 (1964).

Richardson, S.H.: An ion translocase system from rabbit intestinal mucosa. Preparations and properties of the (Na^+-K^+)- activated ATPase. Biochim. Biophys.Acta 150, 572-577 (1968).

Rink, H,G.Geissler und H.D. Bergeder: Über die Regulation des Acetatstoffwechsels von Bäckerhefe durch intra- und extrazelluläre K^+- und Na^+- Ionenkonzentrationen. Hoppe-Seylers Z. physiol.

Chem. 349, 13 (1968).

Robertson, J.D.: "Cellular Membranes in Development". M. Locke ed., Academic Press New York 1964.

Ryter, A.: Etude morphologique de la sporulation de Bacillus subtilis. Ann.Inst.Pasteur 108, 40-60 (1965).

Ryter, A. und F. Jacob: Etude morphologique de la liaison du noyau a la membrane chez E. coli et chez les protoplastes de B. subtilis. Ann.Inst. Pasteur 110, 801-812 (1966).

Ryter, A. und O. Landman: Electron microscope study of the relationship between mesosome loss and the stable L-state (or protoplast state) in Bacillus subtilis. J.Bact. 88, 457-467 (1964).

Salton, M.R.J. und J.H. Freer: Composition of the membranes isolated from several gram-positive bacteria. Biochim. Biophys.Acta 107, 531-538 (1965).

Schlesinger, D.: Protein synthesis by polyribosomes on protoplast membranes of B. megaterium. J.Mol. Biol. 7, 569-582 (1963).

Schneider, W.C.: Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. In "Methods in Enzymology" (ed.S.P.Colowick, N.O.Kaplan), Academic Press, New York 1957. Vol. 3, Seite 680-684.

Schoner, W., C. von Ilberg, R.Kramer und W.Seubert: On the mechanism of Na^+ and K^+ stimulated hydrolysis of adenosine triphosphate. 1.Purification and properties of a Na^+ and K^+- activated ATPase from ox-brain. Europ.J.Biochem. 1, 334-343 (1967).

Schubert, K., G. Rose, H. Wachtel, C. Hörhold und N. Ikekawa: Zum Vorkommen von Sterinen in Bakterien. Europ. J. Biochem. 5, 240-251 (1968).

Shemyakin, M.M., Yu.A. Ovchinnikov, V.T. Ivanov, V.K. Antonov, A.M. Shkrob, I.I. Mikhaleva, A.V. Estratov und G.G. Malenkov: The physicochemical basis of the functioning of biological membranes: conformational specificity of the interaction of cyclodepsipeptides with membranes and of their complexation with alkali metal ions. Biochem. Biophys. Res. Commun. 29, 834-841 (1967).

Shkolnik, M.Ya., E.A. Solov'eva-Froitskaya und A.N. Maevskaya: Reproduction with aid of 8-azaguanin of the morphological changes in sunflower due to boron deficiency. Fiziol. Rast. 12, 876-887 (1965).

Skou, J.C.: The enzymic basis for the active transport of sodium and potassium. Protoplasma 63, 303-308 (1967).

Smith jr., W.C., A.J. Goudie und J.N. Silverton: Colorimetric determination of trace quantities of boric acid in biological materials. Analyt. Chem. 27, 295-297 (1955).

So, A.G., E.W. Davie, R. Epstein und A. Tissières: Effects of cations on DNA-dependent RNA-polymerase. Proc.Nat.Acad.Sci. 58, 1739-1746 (1967).

Stadtman, E.R.: Some considerations of energy metabolism of anaerobic bacteria. Curr.Aspects. Biochem. Energ. 1966, 39-62.

Stahl, E.: "Dünnschichtchromatografie". Springer Verlag Berlin - Göttingen - Heidelberg 1962.

Stein, W.D.: "The movement of molecules across cell membranes". Academic Press, New York 1967.

Stock, C.C., H.C. Reilly, S.M. Buckley, D.A. Clarke und C.P. Rhoads: Azaserin, a new tumor inhibitory substance. Nature 173, 71-73 (1954).

Tao Yu, C. und D. Hirsh: The stimulatory effect of NH_4^+ or K^+ ions on the activity of leucyl-t-RNA - synthetase from E. coli. Biochim. Biophys. Acta 142, 149-154 (1967).

Umbreit, W.W., R.H. Burris und J.F. Stauffer: "Manometric techniques". Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minnesota 1957. Seite 5 - 6.

Vlcek, B.: Acceleration of metal transport in yeast cells treated with a lipophilic complexone. Experientia 23, 1014-1015 (1967).

Waksman, S.A.: "The literature on Streptomycin 1944-1952". Rugers University Press, New Brunswick, N.Y. 1952.

Waksman, S.A. und H. Lechevalier: Neomycin, a new antibiotic active against streptomycin-resistant bacteria including tuberculosis organisms. Science 109, 305-307 (1949).

Weibull, C.: The isolation of protoplasts from Bacillus megaterium by controlled treatment with lysozyme. J. Bact. 66, 688-695 (1953).

Weibull, C., I. Greenawalt und H. Low: The hydrolysis of adenosine triphosphate by cell fractions of Bacillus megaterium. J.Biol.Chem.237,847-852 (1962).

Weitzel, G., A.M. Fretzdorff und S. Heller: Biochemie verzweigter Carbonsäuren. IX.Mitteilung. Monomolekulare Filme der einfach methylierten Palmitinsäure. Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 288, 189-200 (1951).

Welch, W.H., C.L. Irvin und R.H. Himes: Observations on the monovalent cation requirements of formyltetrahydrofolat-synthetase. Biochem. Biophys.Res. Commun. 30, 255-261 (1968).

Wipf, H.K., L.A.R.Pioda, Z. Stefanac und W. Simon: Komplexe von Enniatinen und anderen Antibiotika mit Alkalimetall-Ionen. Helv.Chim.Acta 51, 377-381 (1968).

Wolley, D.W.: "A study of antimetabolites". Wiley, New York 1952.

Zähner, H.: "Biologie der Antibiotica". Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York 1965.

Zittle, C.A.: Reaction of borate with substances of biological interest. Advanc. Enzymol. XII, 493-527 (1951).

L E B E N S L A U F

Ich wurde am 6.10.1937 in Freiwaldau /CSSR als Sohn des Schreiners Alois Pache und seiner Ehefrau Emma, geb. Titze, geboren. 1946 kam ich mit meinen Angehörigen nach Westdeutschland. Von 1947 bis 1954 besuchte ich das Martin-Luther-Gymnasium in Rimbach/Odw. Nach einer Laborantenlehre bei der Firma Knoll, Ludwigshafen, besuchte ich die Chemotechnische Fachschule Darmstadt. Nach dem Examen (1959) war ich als Chemotechniker bei der Firma Boehringer & Söhne, Mannheim, und beim Lebensmitteluntersuchungsamt der Stadt Mannheim angestellt.

Im Herbst 1960 legte ich die Sonderreifeprüfung für Fachschulabsolventen beim Oberschulamt Karlsruhe ab und begann im Mai 1961 mit dem Chemiestudium an der TH Karlsruhe. Nach dem Vordiplom wechselte ich 1963 nach Tübingen, um Biochemie zu studieren. Im September 1966 legte ich die Diplomhauptprüfung in Biochemie ab.

Am 5. August 1966 heiratete ich die Medizinstudentin Kristin Bergmann, und am 29.9.1967 wurde unser erstes Kind geboren.

Mit der Durchführung der vorliegenden Dissertation "Zur Wirkungsweise des Boromycins" begann ich im November 1966 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Hans Zähner am Institut für Mikrobiologie der Universität Tübingen.

Meine akademischen Lehrer waren:

In Karlsruhe : M. Barner, W.Buckel, R.Criegee, R.Dworzak, E.U.Frank, K.Hasse, H.Reinartz, R.Scholder und F. Stöckmann.

In Tübingen : A.Anderer, L.Bauer, E.Bayer, E.Buddecke, E.Bünning, J.F. Cordes, A.Egelhaaf, R.Engelhorn, U.Feine, H.Friedrich-Freska, A. Gierer, A.Gottschalk, K.Grell, G.Hillmann, E.Kallee, F.Lembeck, F.Lingens, W.Loeffler, H.Machleidt, H.Metzner, K.Mörike, E. Müller, W.Reichardt, H.Remmer, A.Rieker, W.Rundel, W.Seyffert, F.Schneider, G.Schramm, B.Schwemmle, G.Weitzel, H.G.Wittmann und H. Zähner.